



TITLE:

T細胞分化におけるインターロイキン7の役割(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

苫名, 充

CITATION:

苫名, 充. T細胞分化におけるインターロイキン7の役割. 京都大学, 1992, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1992-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3088569>

RIGHT:

2

学位申請論文 (Thesis)

T細胞分化における
インターロイキン7の役割

苦名 充

序論 p. 1
第一部 p. 3
第一部のまとめ p. 30
第二部 p. 32
第二部のまとめ p. 50
結語 p. 52
材料と方法（第一部および第二部） p. 53
文献（第一部および第二部） p. 57

[序論]

T細胞（Tリンパ球）は主として胸腺内で分化する（1-3）。それゆえ、胸腺を先天的に欠損したヌードマウスにおいては、機能的T細胞の生成に欠陥がみられる（4）。胸腺はT細胞以外に、上皮細胞（皮質型、髄質型、被膜直下型、の3種類）、マクロファージ（Mφ）、樹状細胞（DC）、繊維芽細胞、ナース細胞（リンパ球を細胞内に取りこんだ像が観察されている）、などのストローマ細胞から構成されている（5）。T細胞は、これら多種類の細胞群との相互作用を介して、幹細胞より機能的T細胞へと成熟するものと考えられる。相互作用としては、種々の接着分子を介した直接的な細胞接着作用と、インターロイキンなどのサイトカインの授受を介した間接的な作用が想定される。一般に、胸腺細胞はCD4抗原とCD8抗原の有無から4つのサブセットに分類され、未熟型である $CD4^- CD8^-$ のdouble negative（DN）細胞、中間段階である $CD4^+ CD8^+$ のdouble positive（DP）細胞、成熟型である $CD4^+ CD8^-$ または $CD4^- CD8^+$ のsingle positive（SP）細胞に分けられる。DN細胞は幹細胞活性を持ち、DP細胞を経てSP細胞にまで分化するものと考えられる（6）。

T細胞の分化を解析するにはこれまで多くの場合、生体を直接用いたin vivoでの実験や、胸腺の器官培養（organ culture）の実験が行われ（7-9）、これらにより多くの進展が見られたが、方法論的に、分子レベルでの解析は困難であった。その意味で、in vitroのモデル系を利用することは有効であると考えられ、胸腺を構成するストローマ細胞を株化することが試みられてきた（10）。ただし、胸腺内でのストロー

マ細胞の多様性から考えて、一種類のストローマ細胞株がT細胞分化の全行程を誘導できるとは考えにくい、複雑な胸腺内でのT細胞分化を単純化する助けにはなるものと思われる。

本学位申請論文第一部ではマウス胎児胸腺から樹立された繊維芽細胞様のストローマ細胞株TS t-4は、DN細胞との共培養により、DN細胞から主としてCD4⁺CD8⁻SP細胞の分化を誘導すること、この過程にはIL-7が重要であることを述べる。またDN細胞と同様、幹細胞活性をもつ胎児胸腺（FT）細胞とTS t-4の共培養では、IL-7 mRNAの産生が増強されていることも、あわせて報告する。第二部では、胎児あるいは新生児胸腺細胞の培養系にIL-7を加えてその効果を解析した結果を述べる。IL-7は $\gamma\delta$ 型T細胞の生成に重要であり、このことは、 $\gamma\delta$ 型T細胞の生成が活発であるFTにおいてIL-7 mRNAが強く産生されていることと対応しているように思われる。以上のことから、IL-7がT細胞の初期分化、特に $\gamma\delta$ 型T細胞の生成に重要であることが強く示唆された。

第一部

胸腺ストローマ細胞株 T S t - 4 による T 細胞分化の 誘導と I L - 7 の関与

T細胞の分化には胸腺が必要であり、胸腺を構成する種々のストローマ細胞が、T細胞の分化・増殖に重要であることが知られている（1 - 3, 10）。これらの知見の多くは、生体を用いた *in vivo* の実験や（1 - 3）、胸腺器官培養を用いた実験（7 - 9）、により導き出されてきた。その結果、方法論的限界により分子レベルでの T細胞分化のメカニズムの解明についてはあまり進んでいないのが現状である。そのため多くの研究室で *in vitro* での研究が試みられており、胸腺ストローマ細胞株の樹立もその一つ的手段として有力であると考えられている（10 - 15）。しかし、現在までのところ、正常な T細胞分化を誘導することができるストローマ細胞株が樹立されたという報告はない。

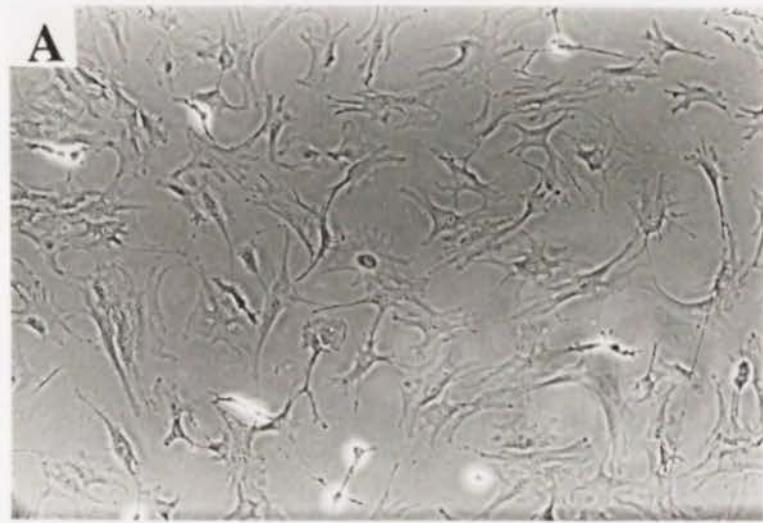
最近、Watanabe らはマウス胎児胸腺由来のストローマ細胞株 T S t - 4 を樹立した（Watanabe et al. submitted）。そこで T S t - 4 を用いた *in vitro* での実験をもとに、T S t - 4 が D N 細胞より C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞、またヘルパー活性を示す細胞の生成を支持し、この現象には I L - 7 が関与することを第一部で述べる。

T S t - 4 の形態と表面形質

胸腺を構成するストローマ細胞としては、上皮細胞、マクロファージ (M ϕ)、樹状細胞 (D C)、繊維芽細胞等が知られており (5)、T S t - 4 がこのうちどのタイプに属するのかを調べるために、その形態及び表面形質について検討を行った。T S t - 4 は C 5 7 B L / 6 マウスの 1 4 日齢胎児胸腺を Whitlock-Witte 培養液中で長期培養し、限界希釈法で 2 回クローニングし、胸腺細胞との接着能を保持しているクローンとして樹立された (参考論文 3)。一方、対照として以下の実験に用いた T S t - 1 0 は C 5 7 L マウスの胸腺腫由来の細胞株であり、いずれのストローマ細胞株も京大・胸部研・免疫学教室で樹立され、Dr. Watanabe より供与された。

図 1 に示したように、両者とも形態的に類似しており、長い突起を出している像が見られ、繊維芽細胞様である。電顕観察では、T S t - 4 はデスモソームとトノフィラメントが陰性であり (都老研・広川博士・未発表データ)、免疫組織化学的にはサイトケラチン陰性、ビメンチン陽性であることから (胸部研・井手山博士・未発表データ)、上皮細胞ではなく繊維芽細胞であることが示唆された。また表面形質については、フローサイトメトリー法により解析をおこない、その結果は表 1 に示したようであった。M ϕ (Mac-1) や D C (NLDC-145) に対する抗原は陰性であり、またここに結果は示さないが、非特異的エステラーゼ活性も陰性であることから、T S t - 4 は胸腺中のストローマ細胞のうち、繊維芽細胞であると思われる。

T 細胞は胸腺内で分化する際、ストローマ細胞上の M H C class-I, -2 抗原との相互作用の結果、最終的に成熟した C D 4⁺ C D 8⁺, C D



Phase contrast micrographs of TSt-4 (A) and TSt-10 (B) cultures (X200).

表 1

Phenotypes of thymic stromal cell lines¹⁾

Surface antigen	TSt-4	TSt-10
Thy-1 ³⁾	-	+
MHC class-1	-(-) ²⁾	+(+)
MHC class-2	-(+)	-(+)
Th-3	-	-
Th-4	+	+
Mac-1	-	-
NLDC-145	-	-
Sca-1	+	+
TER	-	-
M1/69	+	+
pgp-1	+	+
N-CAM	+	+

1) Phenotypic characterization of TSt-4 and TSt-10 was done by flow cytometry analysis

2) Values in parentheses represent those determined after treatment with recombinant γ -interferon (100 units/ml for 3 days) which was donated by Dr. T. Sudo (Biomaterial Research Institute, Kanagawa, Japan).

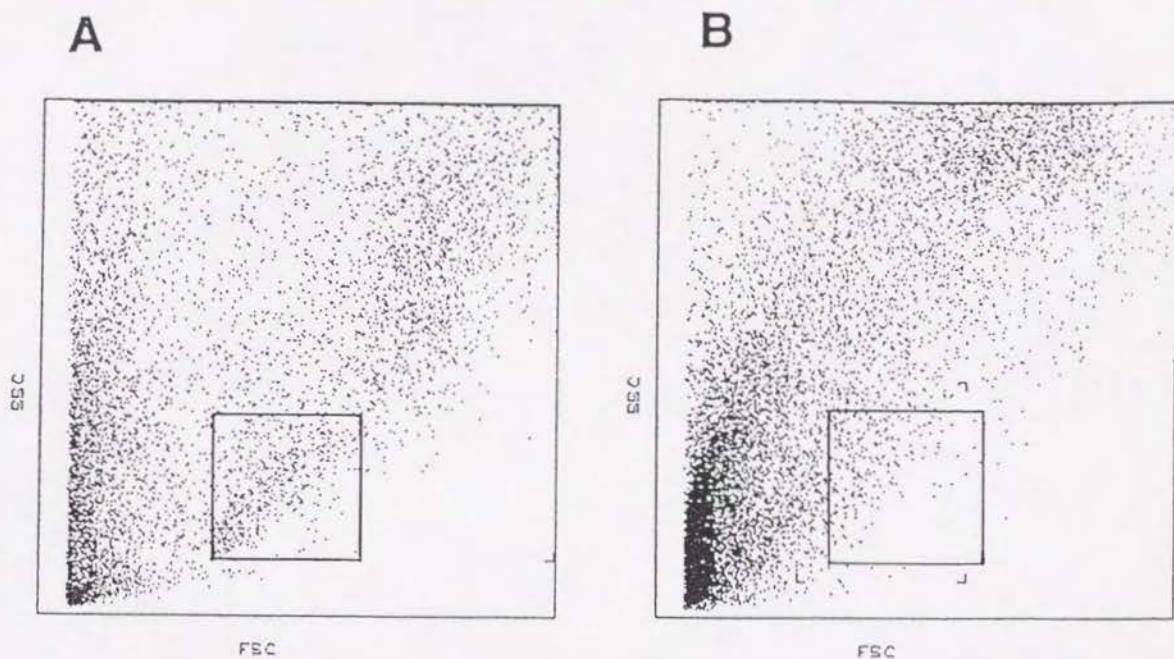
3) Thy-1: T-lineage cell Ag; MHC-class-1(2): major histocompatibility complex class-1(2) Ag; Th-3(4): thymic epithelial cell Ag; Mac-1: M ϕ Ag; NLDC-145: DC Ag; Sca-1: stem cell Ag; TER: erythroid-lineage cell Ag; M1/69: heat stable Ag; pgp-1: phagocytic glycoprotein; N-CAM: N-type cell adhesion molecule

4⁺ C D 8⁻ 細胞になるという説がある (1 6 、 1 7) 。しかし T S t - 4 におけるこれらの抗原の発現について調べたところ、通常は両抗原ともに発現していないことと、インターフェロン (IFN) - γ 刺激によっても、M H C class-2 抗原だけが発現することがわかった。

T S t - 4 の T 細胞分化支持能について

上記の結果より、T S t - 4 は繊維芽細胞であることが示されたが、これまで繊維芽細胞が T 細胞の分化・増殖に果たす役割についての報告はなされていない。そこで次に T S t - 4 が T 細胞の分化を誘導できるかどうかについて検討した。胸腺中の D N 細胞は、成体由来であっても *in vivo* での細胞移入の実験により T 幹細胞活性を含んでいることがわかっている (1 8) 。そこで T S t - 4 の単層培養上に D N 細胞 (T 細胞抗原である T h y - 1 抗原が約 9 0 % 陽性) を加えて 1 週間培養を行い、T 細胞分化が起こったか否かを調べるために、回収した細胞をフローサイトメトリー法により解析した。図 2 A に示すように、多くの細胞が小型のリンパ球分画にあることがわかった。一方、対照として T S t - 1 0 を用いて同様の実験を行ったところ、回収された細胞の大部分はリンパ球よりも大型の細胞であり (図 2 B) 、ここに結果は示さないが多くが Mac-1 陽性であることから、これらは M ϕ 様細胞であるものと考えられた。次に培養後に回収されるリンパ球の細胞数を調べたところ (表 2) 、培養液のみの培養では、6 日後にはほとんど生細胞は回収されなかった。一方、T S t - 4 上の培養では 6 % のリンパ球細胞が維持されていた。また T S t - 1 0 上の培養においては、T S t - 4 に比べてより少数の細胞しか回収されなかった。

図 2



Forward and side scatter analysis of cells recovered from cultures of thymic DN cells on TSt-4 or TSt-10. DN cells were seeded on the monolayers of stromal cells in 24-well plates and cultured for 1 week before assay. A large proportion of living cells recovered from cultures on TSt-4 distributed on the lymphoid fraction (A), whereas the majority of living cells recovered from cultures on TSt-10 distributed on the macrophage fraction (B).

表 2

Cell recovery in cultures of adult DN cells on the monolayer of stromal cell lines¹⁾

Culture days	Recovered cells(%)		
	Medium alone	TSt-4	TSt-10
1	100	50	36
3	7	10	12
6	0.5	6	2

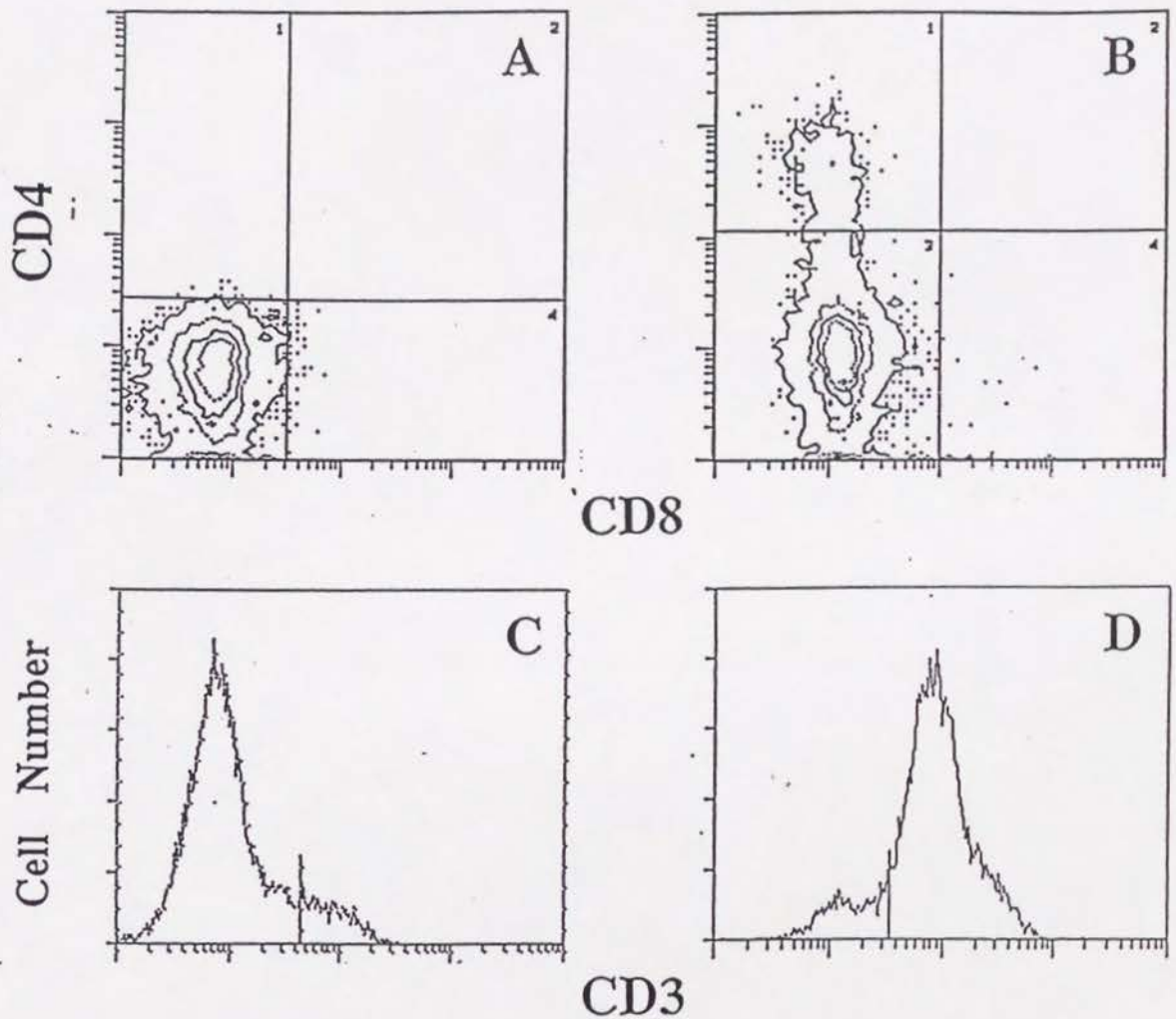
¹⁾DN cells were cultured alone or on the monolayer of stromal cell lines TSt-4 or TSt-10 in 24-well plates. Lymphoid cells were recovered by pipetting, washed, and viable lymphoid cells were enumerated by trypan blue dye exclusion.

T S t - 4 上で回収される細胞の C D 4 / C D 8 の発現パターンについて調べたところ（図 3 B）、約 15 % の細胞が C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞で残りの大部分は D N 細胞であった。またほとんどが C D 3 陽性であり、かなり分化した T 細胞であることが示された（図 3 D）。ところでこれらの C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞が、はじめに少数混入していて、T S t - 4 がその増殖を誘導したために出現してきたという可能性も考えられる。しかし、ここに結果は示さないが胸腺中の C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞だけを T S t - 4 上に加えて 1 週間培養しても、増殖は起こらず逆に始めに加えた細胞数の 70 ~ 80 % にまで減少することから、この可能性は低いものと考えられた。以上の結果から、T S t - 4 は胸腺中の D N 細胞より C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞への分化を支持することがわかった。

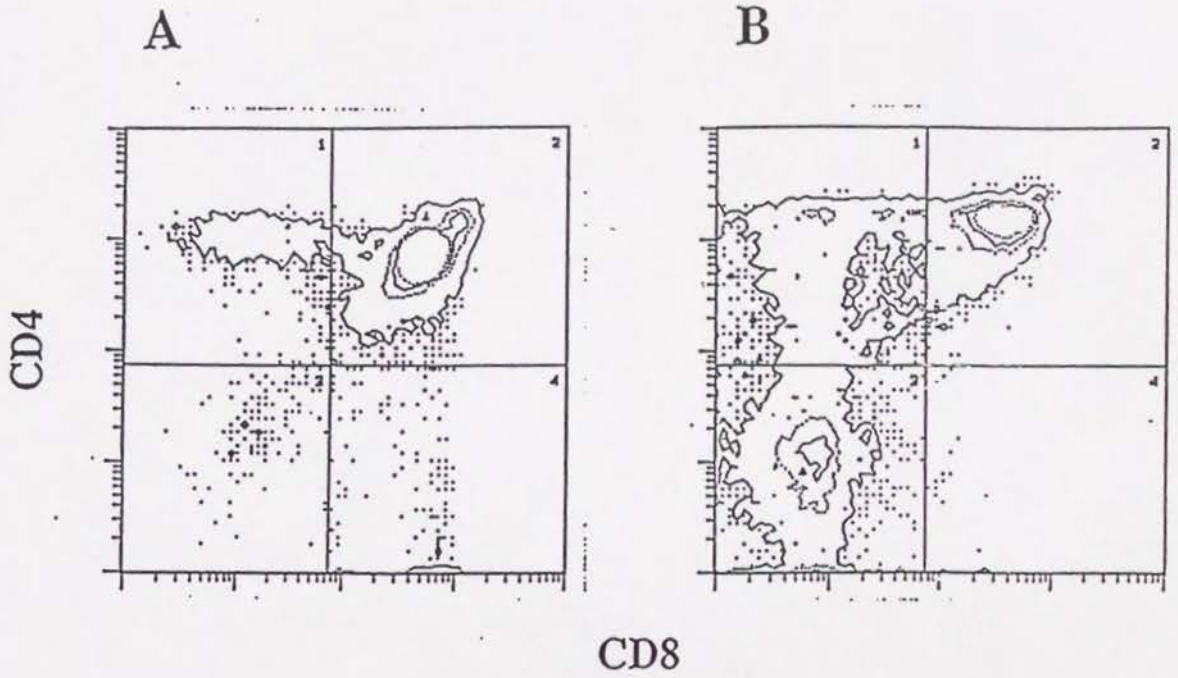
胸腺内での T 細胞分化は一般には D N 細胞より始まり、C D 4⁺ C D 8⁺（D P）細胞の段階を経て最終的に C D 4⁺ C D 8⁻、C D 4⁻ C D 8⁺ の S P 細胞にまで分化するものと考えられている（6）。そこで T S t - 4 単層上での D N 細胞培養の結果生じた C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞が、どのような過程を経て生じたのかを調べるために、分化途上である培養 3 日目に回収される細胞の C D 4 / C D 8 の発現パターンを調べた（図 4）。すると C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞以外に、D P 細胞が多数存在しており、このことから T S t - 4 上で生じた C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞が胸腺内での分化と同様、D P 細胞の段階を経ている可能性が示唆された。

T S t - 4 上で培養した D N 細胞のヘルパー活性

胸腺内で分化・成熟した T 細胞は、細胞表面に C D 4 抗原または C D 8 抗原を発現すると共に、それぞれヘルパー活性（抗体産生の誘導等）、



Development of CD4⁺8⁻ cells by culturing thymic DN cells on the monolayer of TSt-4. DN fraction of thymocytes used for seeding on TSt-4 layer (A, C), and cells recovered 1 week after culturing DN cells on TSt-4 monolayer (B, D) were analysed for CD4 vs CD8 expression (A, B) and CD3 expression (C, D).



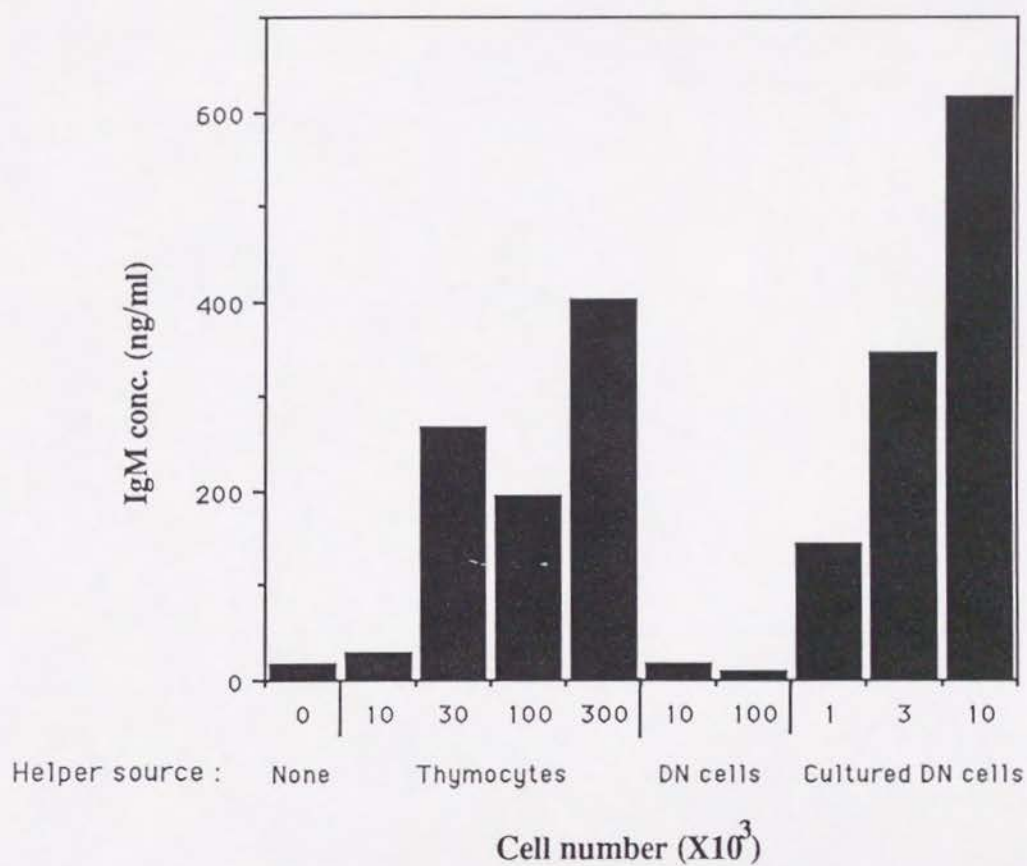
Two-color flowcytometric analysis for CD4 vs CD8 expression of cells cultured on TSt-4. Adult thymocytes (A) and DN cells cultured for 3 days on TSt-4 monolayers (B) were analysed for CD4 vs CD8 expression.

またはキラー活性（標的細胞の破壊等）というT細胞としての機能を示す。そこで次にT S t - 4 上で培養したD N細胞がC D 4 抗原を発現するのと同時に、T細胞機能を獲得したのかどうかを検討するために、そのヘルパー活性の有無について検討した（図5）。T S t - 4 上でD N細胞を1週間培養した後、回収した細胞を用いてC o n Aの刺激下で、B細胞によるポリクローナルI g M産生を測定することにより、培養細胞のヘルパー活性を調べた。培養細胞の場合、細胞数が 10^3 でもヘルパー活性がみられたが、新鮮なD N細胞の場合、細胞数が 10^5 でも有意なヘルパー活性は見られなかった。このことは、もともとヘルパー活性をほとんど持たないD N細胞が、T S t - 4 上で培養された結果、ヘルパー活性を獲得したことを示している。また胸腺細胞全体を用いた場合、ヘルパー活性は細胞数が 3×10^4 以上のときから見られたことから、培養したD N細胞のヘルパー活性は非常に高いといえる。以上のことから、T S t - 4 はD N細胞よりC D 4⁺ C D 8⁻細胞への分化を支持すると同時に、T細胞としての機能の獲得にも働いていることがわかった。

T S t - 4 培養上清中の活性について

T細胞の増殖においては、I L - 2などの可溶性因子が重要な働きをすることが示されている一方で、T細胞分化における役割についてはあまり研究が進んでいないのが現状ではあるが、可溶性因子が細胞の分化においても重要な働きをすることは十分に考えられる。そこでT S t - 4 によるC D 4⁺ C D 8⁻細胞の分化誘導において、T S t - 4 により産生される可溶性因子が関与しているかどうかを調べることにした。ここに結果は示さないが、T S t - 4 の培養上清だけでD N細胞の培養を

5



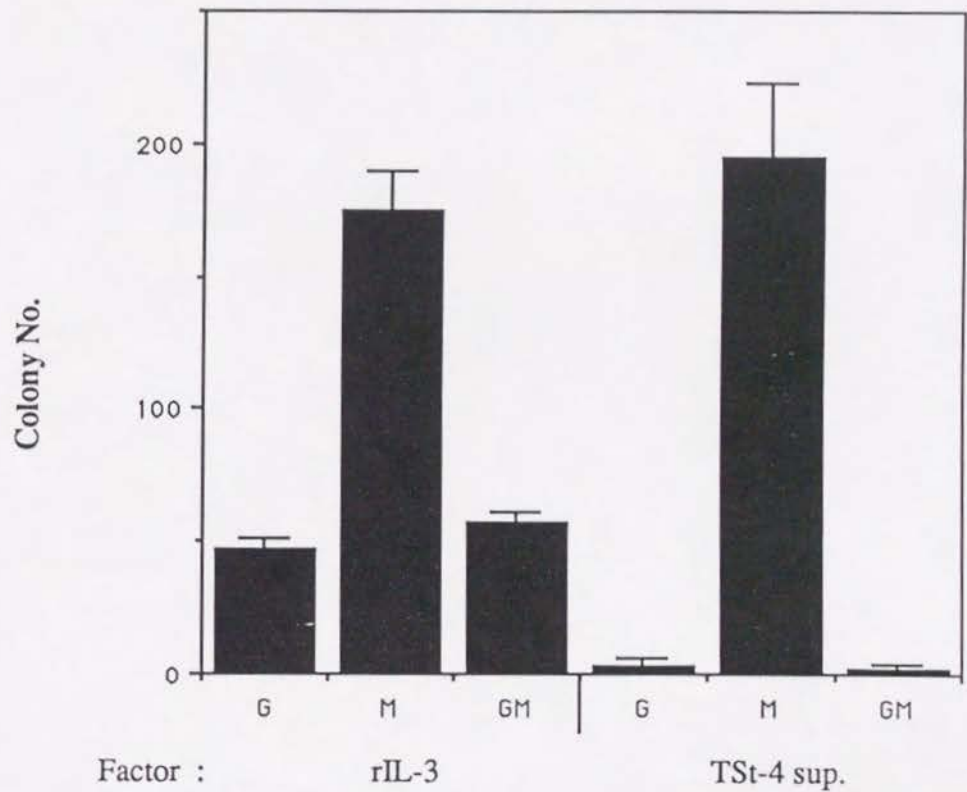
Helper activity of DN cells cultured on TSt-4 monolayer .
 DN cells were cultured on TSt-4 for 1 week, and the helper activity of the recovered cells was determined by polyclonal IgM production of B cells.

行っても、T細胞を維持することはできなかった。このことは、T S t - 4 による分化誘導が、恒常的な可溶性因子をT S t - 4 が産生することによるのではない、ということを示している。このようなT S t - 4 の培養上清によるD N細胞の培養では、Mφ様細胞の増殖が見られるので、上清中のMφ・顆粒球・Mφと顆粒球、に対するコロニー刺激活性について検討した（図6）。対照として用いたI L - 3 の場合とは異なり、T S t - 4 の上清は顆粒球、またはMφと顆粒球の混合コロニーの発現は誘導せず、Mφコロニーの出現を選択的に誘導した。以上のことは、T S t - 4 がMφコロニー刺激因子（M - C S F）を産生していることを示唆している。

可溶性因子産生のノーザンブロッティング（ノーザン）法による解析

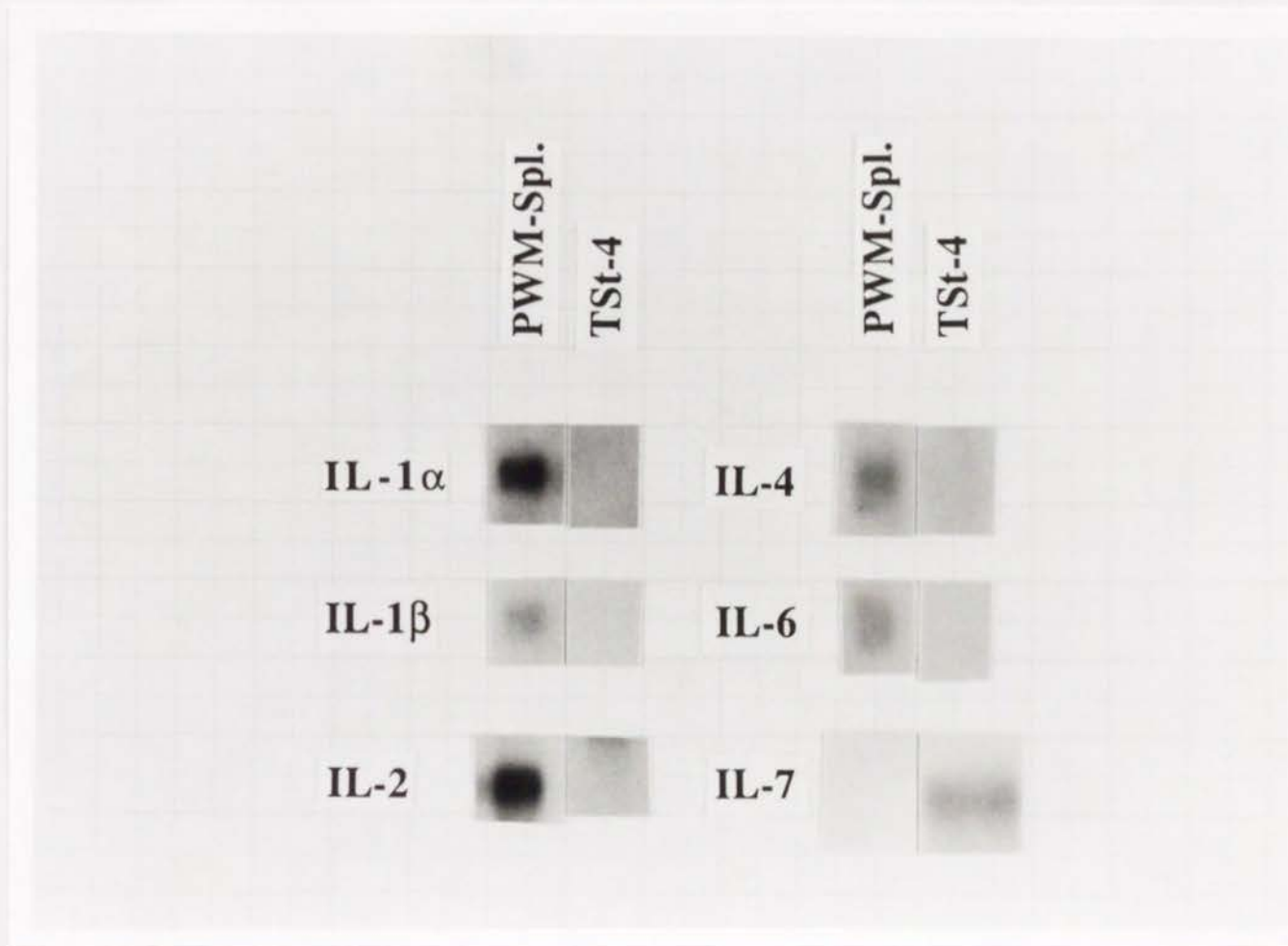
上記のようにT S t - 4 の培養上清だけではD N細胞の分化は誘導できないが、可溶性因子がT S t - 4 と接触している他の細胞に有効に働く可能性も考えられるので、T S t - 4 の産生する因子について、直接的にノーザン法を用いて、m R N A レベルでの発現を調べることにした（図5，6）。調べた因子はI L - 1， - 2， - 4， - 6， - 7，、M -， G -， G M - C S F についてである。各I L については対照としてP W M で刺激したひ細胞を、各C S F については対照として上皮系細胞株であるT E C 1 - 4 C 1 8（都老研・広川博士より供与された）を用いた。その結果、T S t - 4 はM - C S F（図8）、I L - 7（図7）を産生していることがわかった。また、結果は示さないが、I L - 3， I L - 5 の産生は見られなかった。M - C S F の発現については、前項でのべた結果と一致する。m R N A の発現量については、I L - 7 の場

図 6

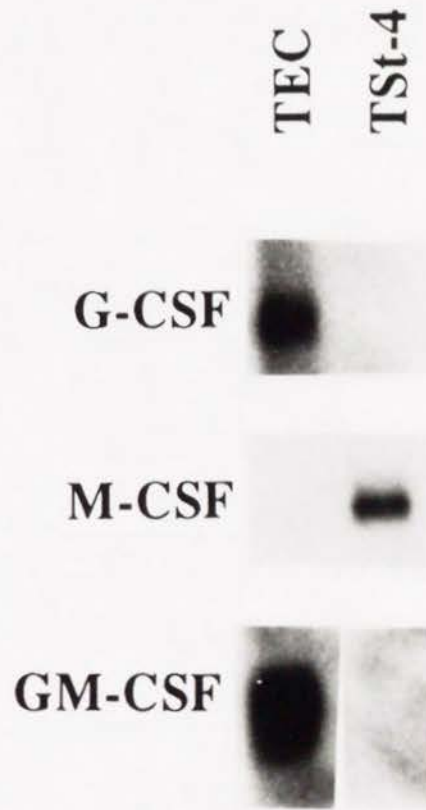


Macrophage colony stimulating activity in culture supernatant of TSt-4 . Colonies were scored on day 8, and mean + SE of triplicate cultures are shown. Only colonies containing more than 100 cells were counted. G, granulocyte; M, macrophage; GM, mixture of granulocyte and macrophage.

図 7



Northern blot analysis of IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and IL-7 mRNAs in TSt-4 and PWM-stimulated spleen cells (PWM-Spl.). The poly(A)⁺RNA was hybridized with each probe. All lanes contained 2 μ g of poly(A)⁺RNA.



Northern blot analysis of G-CSF, M-CSF and GM-CSF mRNAs in TSt-4 and TEC1-4C18. The poly(A)⁺RNA was hybridized with each probe. All lane contained 2 μ g of poly(A)⁺RNA.

合、X線フィルム上にIL-7のバンドを検出するまでのオートラジオグラフィーに要する時間（3日～5日）の長さより考えて（M-CSFの場合は1日以内）、非常に少量であることが予想された。

IL-7によるCD4⁺CD8⁻細胞の分化・増殖の誘導

TS t-4がM-CSF以外に少なくともIL-7を産生していることがわかったので、次にIL-7がDN細胞よりCD4⁺CD8⁻細胞の生成に関与しているのかどうかを調べることにした。培養の方法としては、DN細胞にIL-7のみを加えた場合と、さらにTS t-4とIL-7の両者を加えた場合との二通りについて行った。後者は、CD4⁺CD8⁻細胞の生成に、IL-7以外にTS t-4由来の因子が必要である可能性も考えられることから行った。培養後に回収される細胞数を調べたところ（表3）、培養1週間後にはTS t-4のみを用いた場合に比べて、IL-7を含む培養では約10倍であり（培養液のみの培養では生細胞は回収されなかった）、IL-7がDN細胞に対して増殖または維持に働くことが示された。またIL-7のみの培養において、培養1日目から3日目に細胞数がいったん減少し、以後増加していたが、このことはおそらくDN細胞全体がIL-7に反応するのではなく、一部の細胞がIL-7に反応したことを示しており、これまで報告されているように、DN細胞集団の不均一性を反映しているものと考えられる（19）。次に培養7日後の細胞について、CD4/CD8の発現パターンを調べたところ（図9）、TS t-4のみの場合と同様、IL-7を含む培養では主としてCD4⁺CD8⁻細胞の存在が認められた（図9A, B）。（CD8抗原を低発現している細胞も認められる。）またCD3抗原の発現も、これらの培養ではほとんどの細胞でみられた（図9

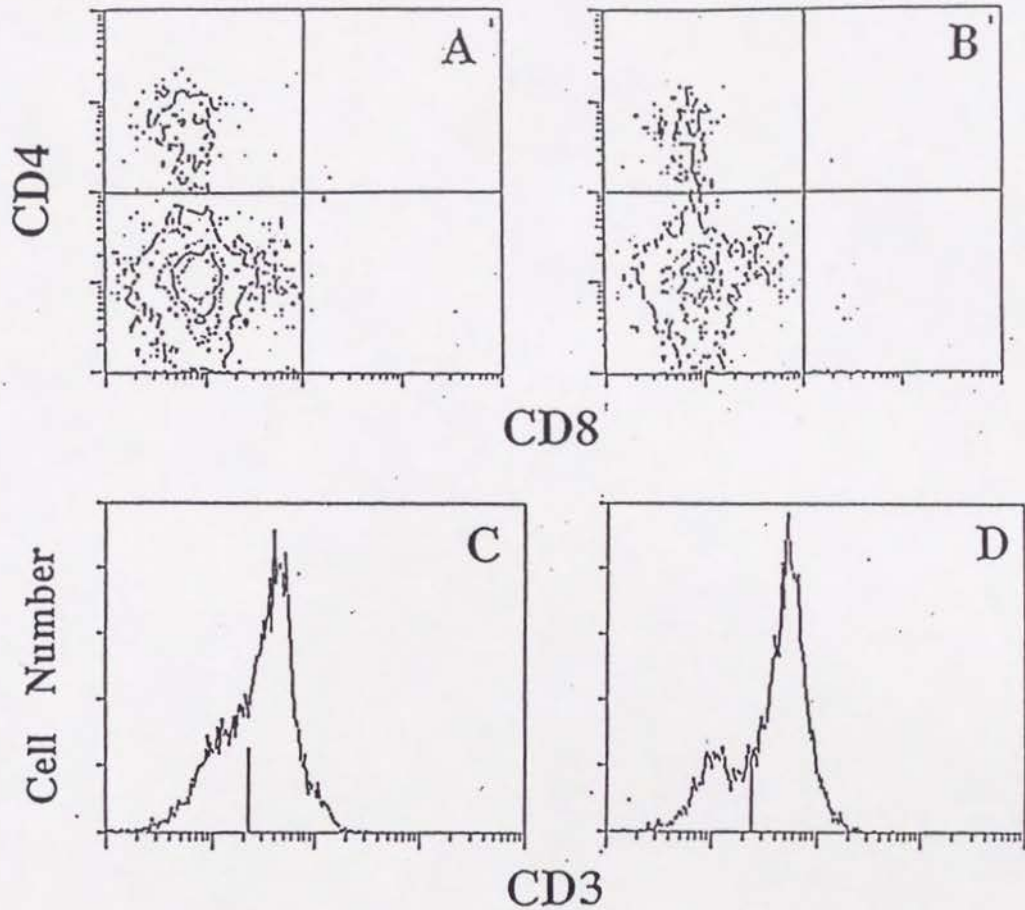
表 3

Cell recovery in cultures of adult DN cells supplemented with IL-7¹⁾

Culture days	Recovered cells(%)			
	Medium		TSt-4	
	none	IL-7	none	IL-7
1	80	84	44	48
3	6	26	26	68
5	ND ²⁾	35	5	48
7	ND	52	5	64

¹⁾DN cells were cultured alone or on the monolayer of TSt-4 , with or without IL-7(100 units / ml) in 24-well plates.Lymphoid cells were recovered by pipetting , washed , and viable lymphoid cells were enumerated by trypan blue dye exclusion.

²⁾Not detected.

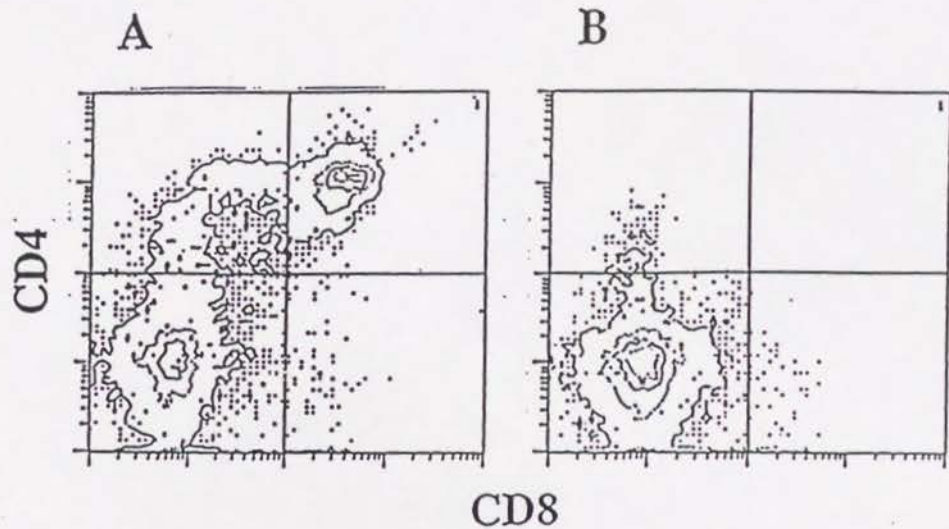


Flowcytometric analysis of cells cultured with TSt-4 plus IL-7 or with IL-7 alone. DN cells were cultured on TSt-4 layer in the presence of IL-7 (100 units/ml) (A, C) or with IL-7 alone (B, D) for 7 days. Cultured cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8 (A, B) or anti-CD3 (C, D).

C, D)。すなわち、IL-7を含む培養とTS t-4のみの培養の結果生じる細胞との間には、差異は認められなかった。以上のことから、DN細胞よりCD4⁺CD8⁻細胞の生成において、IL-7が重要な役割を果たしていることが示された。

TS t-4によるDN細胞からCD4⁺CD8⁻細胞の生成誘導に、IL-7が関与している可能性が示されたが、UckunらはヒトのFT細胞を用いてIL-7の効果を調べている(20)。彼らによれば、サイトカインを加えてFT細胞の培養を1週間行くと、IL-2やIL-6の場合とは異なり、IL-7はCD4⁺CD8⁻細胞の維持または分化・増殖に働いた。ただし、彼らの用いているヒトFT細胞には、もともとDP細胞、SP細胞が含まれており、この現象がSP細胞の維持・分化・増殖のいずれにあてはまるのかについては不明である。

IL-7を含む培養において、DN細胞よりCD4⁺CD8⁻細胞への分化途上の段階にあると考えられる、培養3日目におけるCD4/CD8の発現パターンについて調べた(図10)。TS t-4とIL-7の両者を加えた培養では、TS t-4のみの培養(図4B)と同様にDP細胞の存在が認められたが(図10A)、IL-7のみの培養においてはDP細胞はほとんど認められなかった(図10B)。これは、DP細胞の分化にはIL-7以外のTS t-4由来の因子を必要とすること、TS t-4で生じたCD4⁺CD8⁻細胞が必ずしもDP細胞の段階を通過しているわけではないこと、を示唆している。もちろん、TS t-4上で生じたDP細胞がCD4⁺CD8⁻細胞に分化する可能性が否定されたわけではないが、少なくともCD4⁺CD8⁻細胞に分化する経路として、IL-7によりDN細胞から直接CD4⁺CD8⁻細胞にな



Flowcytometric analysis of cells cultured with TSt-4 plus IL-7 or with IL-7 alone. DN cells were cultured on TSt-4 layer in the presence of IL-7 (100 units/ml) (A) or with IL-7 alone (B) for 3 days. Cultured cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8.

る経路があることが考えられた。

図5においてT S t - 4上で培養されたD N細胞はヘルパー活性を保持することが示されたが、次にI L - 7を含む培養においても、T細胞機能を保持した細胞が生じてくるのかどうか、を混合白血球反応(M L R)において調べることにした。C 5 7 B L / 6マウスD N細胞のT S t - 4とI L - 7の両者を加えた培養から、7日後に回収された細胞を応答細胞として、刺激細胞としてはC 5 7 B L / 6またはB A L B / cマウスのX線照射細胞を用い、M L Rを行った。その結果、D N細胞由来の培養分化T細胞は異系マウスであるB A L B / cマウスの細胞に対してM L R反応を示した(表4)。このことから、I L - 7を含む培養においても、T S t - 4とのみ培養した場合と同様に、分化したT細胞機能を保持する細胞が生成してくることがわかった。

胎児胸腺(F T)細胞との共培養により誘導されるT S t - 4のサイトカイン発現

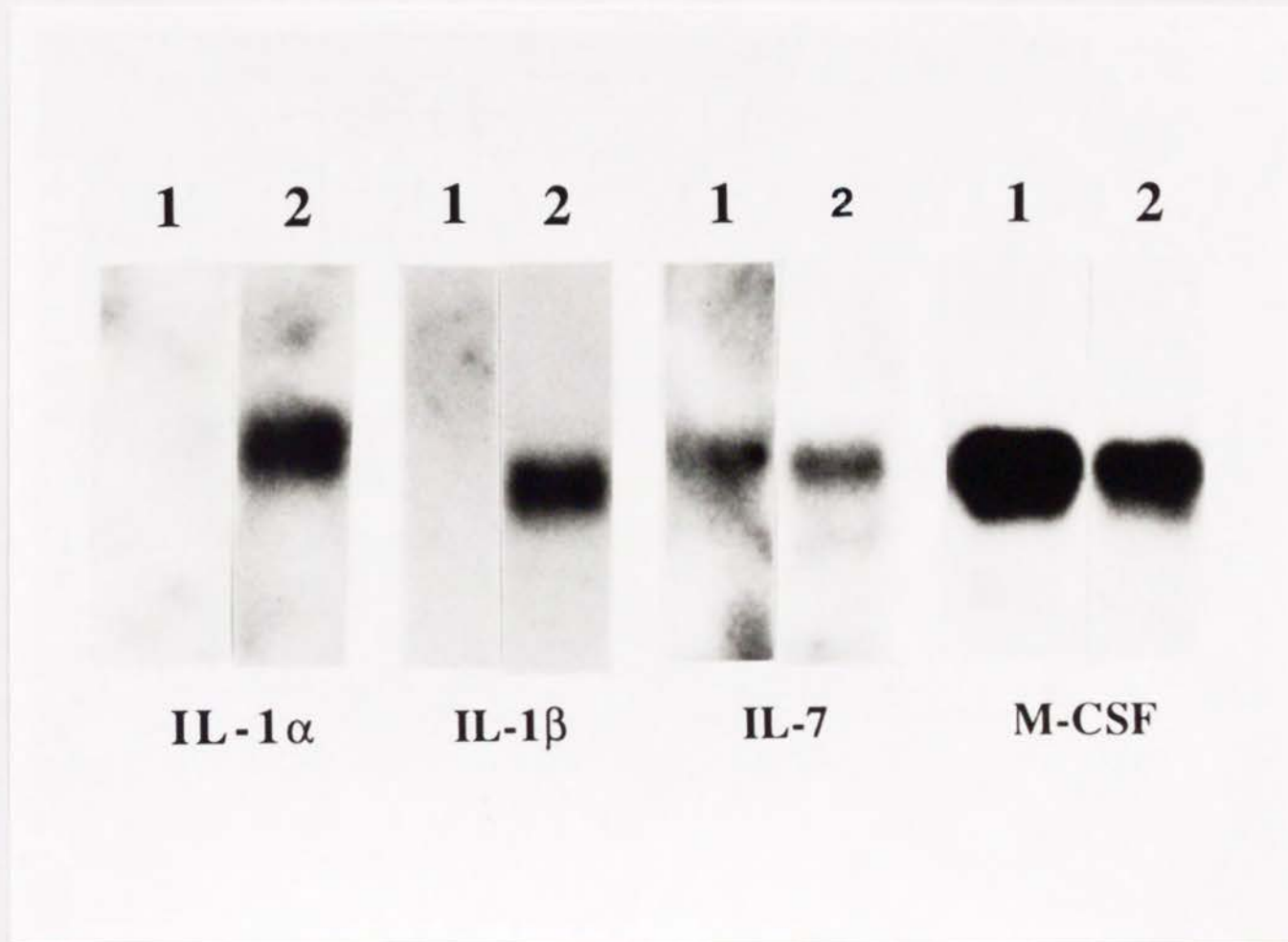
T幹細胞活性を保有する細胞としては、成体胸腺中のD N細胞以外にF T細胞が知られている(3)。そこでT S t - 4上で、胎生15日目のF T細胞を培養したところ、Mφ様の細胞以外に培養10日目頃にはリンパ球細胞の産生が見られる。この時期の培養から、できるだけ浮遊細胞を除いた後、T S t - 4を含む細胞よりR N Aを回収して、ノーザン法にてサイトカインの発現について調べた(図11, 表5)。T S t - 4は無刺激の状態では、M - C S F, I L - 7を産生しているが、F T細胞との共培養の結果、それ以外にI L - 1 α, - 1 βの産生もみられた。ただし、F T細胞との共培養ではリンパ球以外にもMφ様細胞の

表 4

Immunological competence of cultured cells on TSt-4 plus IL-7¹⁾

cell No. of responder	stimulator(cpm)	
	C57BL/6	BALB/c
10 ⁴	1,026	3,468
3x10 ³	680	2,501
10 ³	310	428
3x10 ²	109	314

¹⁾Indicated numbers of responder cells (cultured C57BL/6 DN cells on TSt-4 layer in the presence of IL-7 (100 units/ml) for 7 days), were cultured in 96-well plates (round-bottom) with 3,500 rad-irradiated C57BL/6 or BALB/c spleen cells (5×10^5). The cultures were harvested after 5 days, and [³H] TdR was added to each well 8 hr before harvest.



Northern blot analysis of IL-1 α , IL-1 β , IL-7 and M-CSF mRNAs in TSt-4 (1) and TSt-4 cultured with fetal thymocytes for 10 days (2). The poly(A)⁺RNA was hybridized with each probe. All lanes contained 2 μ g of poly(A)⁺RNA.

表 5

mRNA expression of TSt-4 cultured with fetal thymocytes¹⁾

mRNA	TSt-4	
	none	fetal thymocytes
IL-1 α	-	+
IL-1 β	-	+
IL-2	-	-
IL-6	-	-
IL-7	+	++
G-CSF	-	-
M-CSF	+	+
GM-CSF	-	-

¹⁾mRNA expression of TSt-4 alone or TSt-4 co-cultured with d15 fetal thymocytes for 10 days , were examined by Northern blotting.

産生が見られるので、 $IL-1$ に関しては、これら $M\phi$ 様細胞が産生している可能性が高い。 $IL-7$ に関しては、 $TS t-4$ は無刺激の状態に比べて FT 細胞との共培養を行った場合、その発現を増強していた。このことは、必ずしも $TS t-4$ により $IL-7$ の産生が増強されたことを示すわけではないが、培養中での $IL-7$ 産生の増強とリンパ球の産生との間に、密接な関連があることを示唆している。以上のことから、未分化な T 細胞である DN 細胞だけでなく、 FT 細胞においても、 $TS t-4$ によるリンパ球の産生に $IL-7$ が関与している可能性が示された。

$TS t-4$ による DN 細胞から $CD4^+ CD8^-$ 細胞の生成は、 $TS t-4$ による恒常的な可溶性因子の産生のみによるものではない。これは一つには、分化を誘導する因子が $TS t-4$ の細胞表面上に存在するという可能性、または DN 細胞と $TS t-4$ とが相互作用することにより、分化誘導因子が $TS t-4$ により産生されるという可能性とが考えられる。後者に関して Sudo らは、ストローマ細胞株が $pre-B$ 細胞株と相互作用することにより $IL-7$ の産生を増強する、という結果を示している(21)。 $TS t-4$ の場合も、 FT 細胞との共培養の結果、 $IL-7$ の産生の増強がみられたので(ただし、この場合 $TS t-4$ が $IL-7$ の産生を増強している、と断定はできない)、この可能性は十分に考えられる。また前者の可能性については、サイトカインなどの増殖因子が細胞表面に結合した形でも存在している、という事実より支持される(22)。たとえば、 EGF 、 $TGF-\alpha$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $M-CSF$ 、 SCF 、 $GM-CSF$ などがその例としてあげられる。 $TS t-4$ に関しても、 $IL-7$ などの増殖因子が細胞表面に結合した形で存在

することが考えられる。

T S t - 4 以外のストローマ細胞株についての考察

in vitroでT細胞分化を研究するために、他の研究室でも胸腺由来のストローマ細胞株が樹立され、その中には胸腺中でのT細胞の分化を反映すると思われる細胞株もある。Nakashima らは2週齢のマウス胸腺に由来するストローマ細胞株を樹立した(23)。これは形態的には敷石状の細胞で、部分的にトノフィラメント、デスモゾーム状の構造をもっているため、上皮細胞由来であると推定されている。この細胞株は胸腺細胞との共培養の結果、D P細胞を選択的に除去するため、D P細胞の胸腺からの除去という現象を解析するために有効である、と論じている。Hiramineらも同様の機能を示す細胞株を樹立している(24)。胸腺の上皮細胞由来で、上記の機能以外に、胸腺細胞との混合培養の結果、ロゼットの形成とその後ナース細胞の形成へと移行することから、T細胞分化において重要であることが示唆されているナース細胞の形成を研究するのに有効であろう。Nishimura らは胸腺腫に由来するナース細胞様のストローマ細胞株を樹立した(25)。彼らのストローマ細胞株上でD P細胞をI L - 2、抗C D 3抗体の存在下で培養を行うと、C D 3⁺ C D 4⁻ C D 8⁺ のT細胞が出現した、と報告している。したがって彼らの細胞株は、D P細胞よりC D 4⁻ C D 8⁺ 細胞への分化を研究するのに有用であると考えられる。次に Tatsumi らが樹立したストローマ細胞株は、D N細胞との共培養を1日行うことで、C D 4⁻ C D 8⁺ 細胞の出現を誘導する(26)。これはほとんどがC D 3⁻ 細胞であることから、未分化な段階のC D 4⁻ C D 8⁺ 細胞であると考えられる。ま

た共培養を続けることで、D P細胞、C D 4⁺ C D 8⁻細胞の出現がみられた。残念ながらここで出現したC D 4⁺ C D 8⁻細胞がC D 3⁺細胞であるのか、またヘルパー活性を保有しているのか、ということについては言及されていない。もしそうであるならば、彼らの細胞株はT S t - 4と同系列のストローマ細胞株であるといえよう。

以上、胸腺より樹立されたストローマ細胞株について述べたが、現状では胸腺内のT細胞の分化・増殖を再現するには至っていない。しかし胸腺機能の一部を代行するような細胞株は得られているので、今まで同様新たなストローマ細胞株を樹立する一方で、複数種類の細胞株を用いることで分化・増殖の誘導を試みることも必要であろう。

第一部のまとめ

胸腺内のT細胞の分化を *in vitro* で研究するために、胸腺ストローマ細胞株T S t - 4を用いてT細胞の分化誘導を行い、それに関与する分子の同定を試みた。結果は以下に示す通りである。

- 1) T S t - 4はその形態と表面形質から繊維芽細胞であると考えられる。
- 2) T S t - 4はD N細胞よりC D 3⁺ C D 4⁺ C D 8⁻細胞の生成、またヘルパー活性を保有する細胞の生成を誘導し、分化の途上でD P細胞の存在が認められた。
- 3) T S t - 4の培養上清中にはM - C S Fの活性が認められた。
- 4) T S t - 4によるサイトカインの産生をノーザン法にて調べたところ、M - C S F以外にI L - 7の産生がみられた。
- 5) I L - 7により、D N細胞の培養後に回収される細胞数は、T S t

- 4 のみの培養に比べて増加し、主として $CD3^{+} CD4^{+} CD8^{-}$ 細胞の生成、また M L R 反応細胞の生成が誘導された。ただし、I L - 7 のみによる培養では、分化の途上において D P 細胞はみられず、この点は T S t - 4 による培養の結果とは異なっていた。

6) T S t - 4 と F T 細胞との共培養を行うと、I L - 7 の産生が増強していることが見出された。

以上のことから、T S t - 4 は D N 細胞の分化を誘導、F T 細胞と相互作用し、これらの現象に I L - 7 が関与していることが強く示唆された。

第二部

IL-7による $\gamma\delta$ 型T細胞の誘導

第一部では胸腺ストローマ細胞株TSt-4が、胸腺中のDN細胞よりヘルパー活性やMLR反応性を保有するCD3⁺CD4⁺CD8⁻細胞への分化誘導を行い、この現象にはおそらくIL-7が関与していること、またTSt-4とFT細胞との共培養によりリンパ球の産生がみられ、その際IL-7の発現が増強していることから、IL-7が*in vitro*でのT細胞の分化・増殖において重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで第二部では、*in vivo*に近い状態でのT細胞の分化・増殖におけるIL-7の役割を調べることを目的として実験を行った。

研究材料としては、胎生15日目の胎児胸腺(FT)と生後3日目の新生児胸腺(NBT)を用いた。NBTは成体胸腺と比較すると、CD3、CD4、CD8抗原などの発現パターン、胸腺の構造などからみてほぼ同じであると考えられる。IL-7の効果を調べるために、上記の細胞の培養を以下に示す二通りの方法で行った。はじめにまず細胞浮遊培養(suspension culture: SC)を行い、これはIL-7の胸腺細胞に対する直接的な効果を調べるのに有効であると考えられる。第二の方法としては、浸水器官培養(submersioned organ culture: SOC)法を用いた。これはWatsonらにより使われた方法で、胸腺器官を培養液中に沈めて培養を行うものである(27)。一方、通常の胎児胸腺器官培養であるfetal thymus organ culture(FTOC)では、胸腺を培養

液上に浮かべて培養を行う。SOCは胸腺という環境の存在下において、IL-7の効果調べる上で有効である。

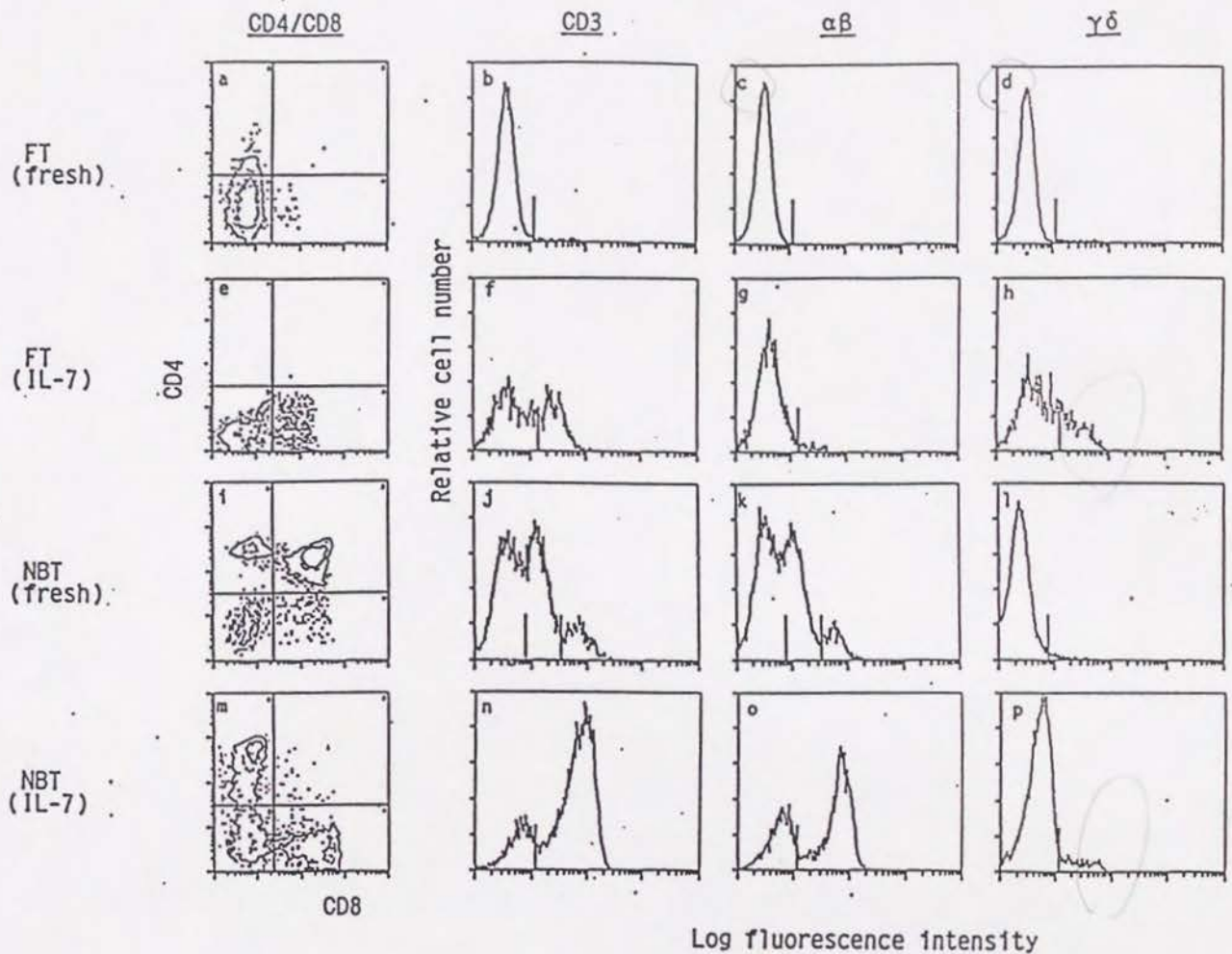
胎児胸腺細胞の浮遊培養 (FTSC)

はじめにFT細胞を用いてSCを行い(FTSC)、IL-7による効果を調べた。胎生15日目のFT細胞はもともとCD4抗原を低レベルで発現しているが(図12a)、CD3抗原はほとんど発現しておらず(図12b)、これらはT細胞受容体として $\alpha\beta$ ではなく $\gamma\delta$ を発現している(図12c, d)。IL-7を加えない場合、培養1週間後には生細胞はほとんど回収されなかった(表6)。一方、IL-7を加えて2週間の培養を行うと、細胞は回収されたが、細胞数ははじめの約10分の1となり減少していた。また高い細胞の割合がCD3抗原を発現しており(図12f)、これは $\gamma\delta$ 型T細胞であった(図12h)。図13Aにおいて $\alpha\beta$ 型T細胞、 $\gamma\delta$ 型T細胞の割合を時間経過を追って調べている。 $\gamma\delta$ 型T細胞の割合の増加が見られるが、細胞数に関しては培養前とほとんど変化がなかった(表6)。またCD4/CD8の発現パターンについては、多くのCD4⁻CD8⁺細胞がみられた(図12e)。

以上の結果からFT細胞に対するIL-7の直接的な効果としては、 $\gamma\delta$ 型T細胞に働くことがわかったが、増殖と維持のどちらに働いているのかについては不明であった。

新生児胸腺細胞の浮遊培養 (NBTS C)

次にNB T細胞を用いてSCを行い(NBTS C)、成熟T細胞を含



Flowcytometric analysis of cells generated in IL-7-supplemented cell-suspension cultures of FT and NBT cells. FT cells (e-h) and NBT cells (m-p) were cultured for 2 weeks in the presence of IL-7 (100 units/ml) and analysed. As controls, noncultured (fresh) FT cells (a-d) and NBT cells (i-l) were also analysed. Two-dimensional analysis for CD4 vs CD8 (a, e, i and m), and expression of CD3 (b, f, j and n), TCR $\alpha\beta$ (c, g, k and o), and TCR $\gamma\delta$ (d, h, l and p) are shown. Vertical bars in the histograms indicate the level beyond which staining was regarded positive.

表 6

Effect of IL-7 on the generation of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in cell suspension culture

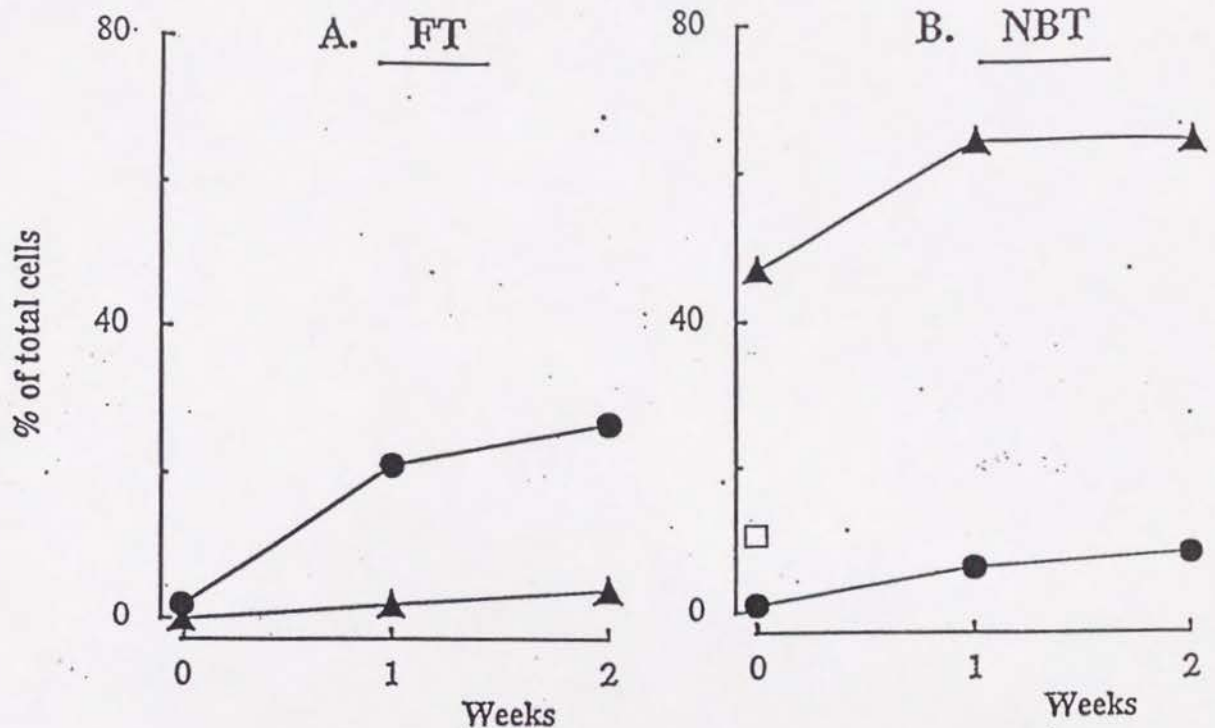
Cell source	Factor	Culture period (weeks)	Recovered cells per well($\times 10^3$) ^a		
			Total	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$
FT		0	200 ^b	0	4.0
	None	1	1.4 \pm 1.2	<0.1	<0.1
	None	2	0.4 \pm 0.3	ND ^e	ND
	IL-7	1	25 \pm 3	0.5	5.3
	IL-7	2	16 \pm 5	0.6	4.3
NBT		0	200 ^b	94 (19) ^d	2.0
	None	1	<0.1	ND	ND
	IL-7	1	27 \pm 4	17	1.6
	IL-7	2	19 \pm 6	12	1.5

^a Total cell numbers after culture represent means \pm SD of triplicate cultures. The numbers of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells were calculated by multiplying the mean number of recovered cells by percentages of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells, respectively.

^b Number of cells cultured per well.

^c ND = Not determined.

^d The number in parenthesis represents that of TCR $\alpha\beta$ high positive cells.



IL-7 supports the growth of both $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells in cell suspension culture. FT cells (a) or NBT cells (b) were cultured in the presence of IL-7. The proportions of $\gamma\delta$ T cells (●) and $\alpha\beta$ T cells (▲) before culture and 1 and 2 weeks after culture are depicted. In (b), the percentage of TCR $\alpha\beta$ high positive cells in NBT before culture is shown with an open square.

む胸腺細胞に対する I L - 7 の直接的な効果について調べた。N B T は成体胸腺とはほぼ同様の C D 4 / C D 8、C D 3、 $\alpha \beta$ 、 $\gamma \delta$ の発現パターンを示し（図 1 2 i ~ l）、T 細胞受容体を発現する T 細胞のほとんどが $\alpha \beta$ 型 T 細胞であり、 $\gamma \delta$ 型 T 細胞は非常に少ない。I L - 7 を加えないで培養を 1 週間行くと、F T 細胞の場合と同様、生細胞はほとんど回収されなかった。一方、I L - 7 を加えて培養を行った場合、細胞数は 2 週間後には、はじめの約 1 0 分の 1 となり減少していた（表 6）。

$\alpha \beta$ 型 T 細胞、 $\gamma \delta$ 型 T 細胞の割合は図 1 3 B に示したように、 $\alpha \beta$ 型 T 細胞が一貫して優勢を占めていた。細胞数については、 $\gamma \delta$ 型 T 細胞は培養前とあまり変わらないが、 $\alpha \beta$ 型 T 細胞は約 8 分の 1 とかなり減少していた。ただし、培養前の成熟した T 細胞と考えられる、 $\alpha \beta$ を高発現している細胞の数と比較した場合、その差はあまりないと言える。C D 4 / C D 8 の発現パターンに関しては、C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞と C D 4⁻ C D 8⁺ 細胞の S P 細胞が多くみられる一方、D P 細胞はほとんどみられなかった（図 1 2 m）。以上の結果から、N B T 細胞に対する I L - 7 の直接的な効果としては、T 細胞受容体を保有する T 細胞の増殖または維持に働くということがわかった。以上、F T 細胞と N B T 細胞を用いて S C を行うことにより、I L - 7 の直接的な効果について調べた結果、I L - 7 は用いた胸腺細胞の時期によらず、主として T 細胞受容体を保有する細胞に対して働くことがわかった。ただし、それが細胞の維持または増殖のどちらに働いているかは不明である。

第一部では成体胸腺の D N 細胞を用い、I L - 7 を加えて細胞浮遊培養を行うと C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞が出現した（図 9）。この細胞は一般的に $\alpha \beta$ 型 T 細胞と考えられるが、新鮮な成体 D N 細胞中には $\gamma \delta$ 型 T

細胞は非常に少ないものと考えられるので、第二部の結果と矛盾しないと考えられる。

これまで I L - 7 の T 細胞に対する効果を、S C に I L - 7 を加えて調べた他の研究室による報告としては、以下にあげる通りである。まず成熟した T 細胞の C o n A に対する応答性の誘導 (28)、C T L 活性を示す T 細胞の誘導 (29)、各種 T 細胞の増殖の誘導 (30、31)、などが報告されている。また胸腺中の各サブセットのうち、I L - 7 に反応して増殖するのは、D P 細胞を除く D N、S P 細胞である (30)。また D N 細胞の中には C D 3⁺ 細胞が存在し、D N 細胞を C D 3⁺ 細胞と C D 3⁻ 細胞の二つに分けた場合、増殖するのは前者である (32)。ただし、後者は I L - 7 により増殖はしないのだが、維持はされるようである (33)。また胎生 14 日目または 15 日目の胸腺細胞は、I L - 7 により増殖反応が誘導される (27)。これらの結果を総合すると、I L - 7 に反応して増殖するのは、より分化の進んだ、すなわち T 細胞受容体を保有する T 細胞であると考えられ、これは今回示したデータと一致するものと考えられる。

胎児胸腺の浸水器官培養 (F T S O C)

次に S O C を行うことにより、I L - 7 が胸腺という環境内で及ぼす効果について調べた。はじめに胎生 15 日目の F T を用いて調べた。対照として I L - 7 を加えないで培養を 2 週間行った場合、細胞数ははじめの約 4 分の 1 となっている (表 7)。C D 4 / C D 8 の発現パターンをみると (図 14 a) D N、D P、S P 細胞の全てのサブセットがみられた。また $\alpha \beta$ 型 T 細胞、 $\gamma \delta$ 型 T 細胞の割合は (図 15 A)、 $\alpha \beta$ 型

Effect of growth factors on the generation of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in submersion organ culture (SOC)^a

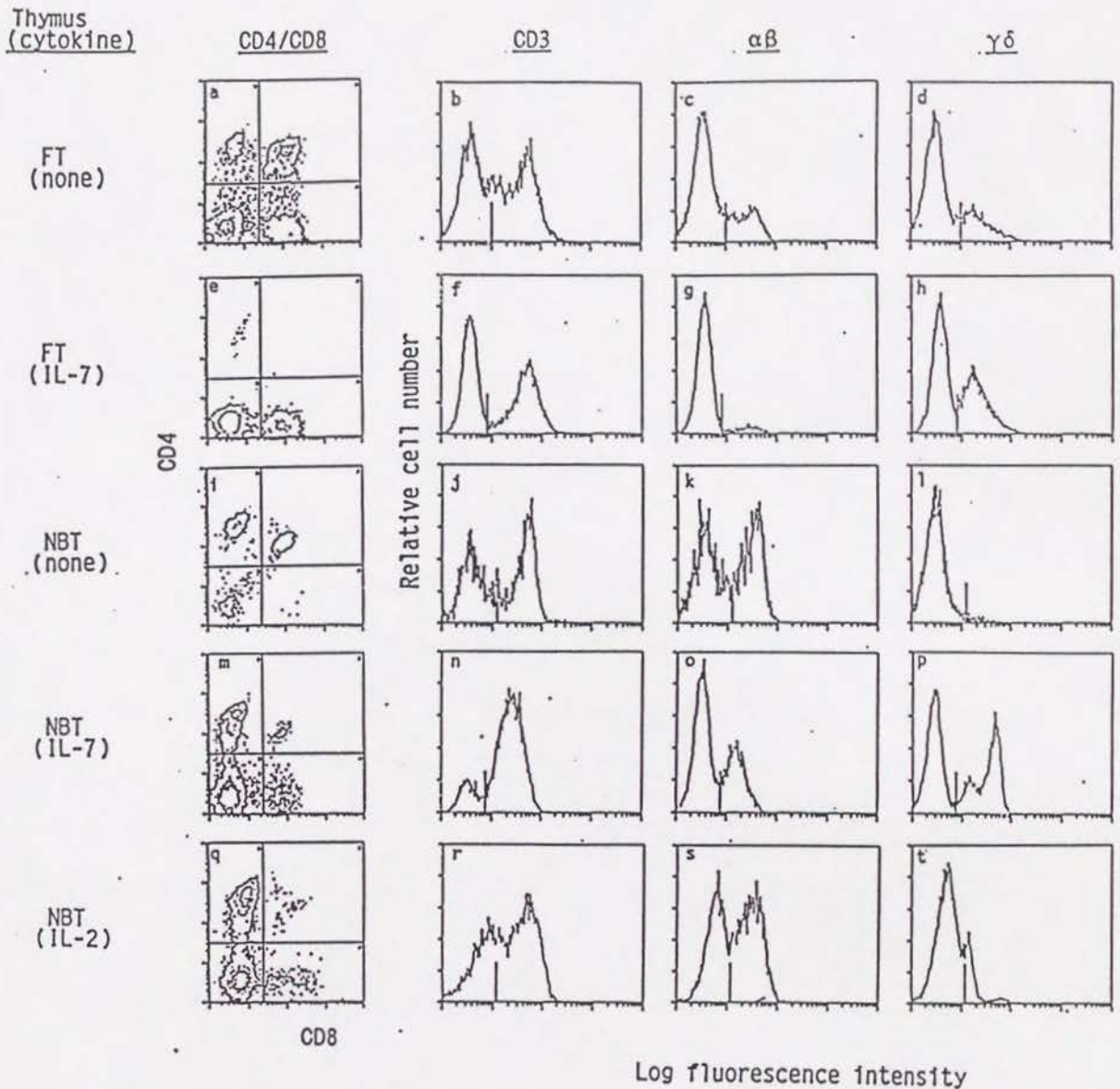
Thymus	Factor	Culture period (weeks)	Recovered cell number per lobe ($\times 10^3$) ^b		
			Total	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$
FT		0	120 ^c	0	2.4
	None	1	37 \pm 6	5.2	6.7
	None	2	32 \pm 19	7.7	7
	IL-7	1	130 \pm 40	2.6	30
	IL-7	2	290 \pm 50	17	120
NBT		0	11000 ^c	5200 (1000) ^d	110
	None	1	260 \pm 160	130	7.8
	None	2	35 \pm 18	17	0.7
	IL-7	1	790 \pm 90	380	100
	IL-7	2	1800 \pm 600	590	790 (630)
NBT		0	12000 ^c	5600 (1100)	120
	None	1	420	290	13
	None	2	56 \pm 6	25	1.1
	IL-2	1	1400 \pm 140	1100	98
	IL-2	2	1100 \pm 310	620	190 (25)

^a FT or NBT were organ-cultured at one lobe per well.

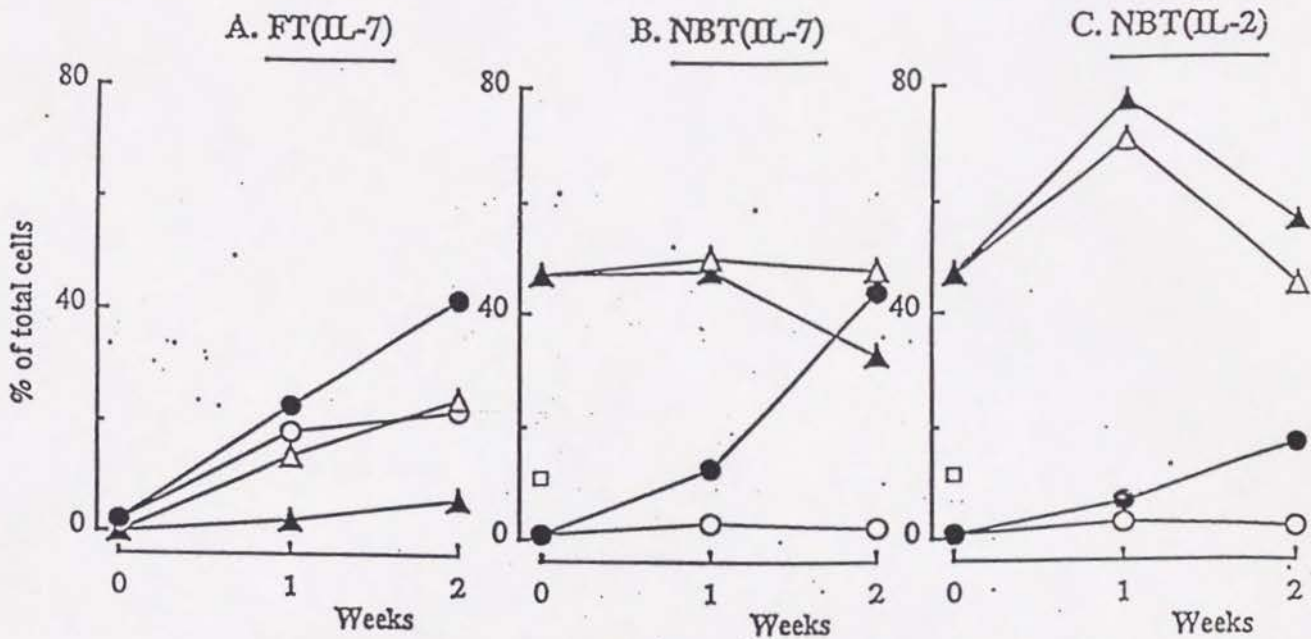
^b Total cell numbers after culture represent means \pm SD of triplicate cultures. The numbers of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells were calculated by multiplying the mean number of recovered cells by percentages of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells, respectively.

^c Mean number of cells per lobe before culture.

^d The number in parenthesis represents that of TCR high positive cells.



Flowcytometric analysis of cells generated in FT-SOC and NBT-SOC performed in the absence or presence of IL-7 or IL-2. Thymus lobes were cultured for 2 weeks, and the cells were analyzed for CD4 vs CD8 profiles (a, e, i, m and q), and for expression of CD3 (b, f, j, n and r), TCR $\alpha\beta$ (c, g, k, o and s) and TCR $\gamma\delta$ (d, h, l, p and t).



IL-7 preferentially supports the growth of $\gamma\delta$ T cells in SOC. FT (a) or NBT (b) were cultured in the absence (open symbols) or presence (filled symbols) of IL-7. In (c), NBT were also cultured in the absence (open symbols) or presence (filled symbols) of IL-2. The proportions of $\gamma\delta$ T cells (circles) and $\alpha\beta$ T cells (triangles) are depicted. In (b) and (c), the percentages of TCR $\alpha\beta$ high positive cells in NBT before culture are shown with an open square.

T細胞、 $\gamma\delta$ 型T細胞が同程度の割合で見られた。次にIL-7を加えて培養を行った場合、細胞数は2週間後にははじめの約2.5倍となり増加が認められた(表7)。またCD4/CD8の発現パターンを見ると(図14e)、DN細胞とCD4⁻CD8⁺細胞が見られた。 $\alpha\beta$ 型T細胞、 $\gamma\delta$ 型T細胞の割合は(図15A)、培養後は $\alpha\beta$ 型T細胞に比べて、 $\gamma\delta$ 型T細胞の割合が非常に増加しているのがわかった。そして細胞数に関しては、 $\alpha\beta$ 型T細胞はIL-7を加えない場合に比べて、IL-7を加えた場合、約2倍の増加がみられる一方、 $\gamma\delta$ 型T細胞はIL-7を加えた場合、対照に比べて約17倍という大幅な増加が認められた。以上の結果から、IL-7は胎児胸腺という環境内でも、主として $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖に働くことがわかった。

IL-7による $\gamma\delta$ 型T細胞の生成の誘導は、SCでは起こらずSOCの系で起こることから、IL-7単独によるシグナルというよりも、むしろそれ以外の胸腺中のストローマ細胞などによるシグナルと共にIL-7が働いて、 $\gamma\delta$ 型T細胞の生成を誘導している可能性が考えられる。実際このようなIL-7とストローマ細胞の両方に依存する段階が存在することは、pre-B細胞について報告されている(34)。

これまで上記のように胸腺という環境内で、 $\gamma\delta$ 型T細胞の生成を誘導する因子としては、IL-2がCeredigらにより報告されている(35)。彼らは胎生14日目のFTを用いてSOCを行い、培養中にIL-2を加えると、培養5日後に調べたところ、DN細胞とCD4⁻CD8⁺細胞が認められ、両サブセットは共にCD3⁺細胞を含んでいた。そしてノーザン法を用いて、回収された細胞のT細胞受容体の発現を調べたところ、 γ 、 δ は完全長のRNAを発現していたが、 α の発現は認

められなかった。このことから彼らは、この培養により出現した細胞は $\gamma\delta$ 型 T 細胞であると結論している。ただし、彼らのデータからは $\gamma\delta$ 型 T 細胞の細胞数に関しては不明であり、IL-2 と IL-7 による $\gamma\delta$ 型 T 細胞に対する増殖効果を直接に比較することは難しい。

また $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成を誘導する他の因子として IL-4 があげられる。IL-4 はとくにヒトの T 細胞を用いて、CD3 抗原を未だ発現していない、pro-T 細胞と呼ばれる未熟な T 細胞の培養の際に加えることで、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成を誘導することが示された (36)。しかしマウスの胎生 14 日目の FT で、普通の器官培養 (FTOC) を IL-4 を加えて行ったところ (37)、細胞数は IL-4 を加えない対照に比べて減少し、また $\gamma\delta$ 型 T 細胞に関しても、細胞数の増加は認められなかったことから、IL-4 がマウスの $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成に関与していることについては、現在までのところ否定的である。

また Watson らはマウスの胎生 12 日目から 14 日目の FT を用いて SOC を行い、IL-7 を加えてその効果を調べている (27)。まずはじめに FTOC を行った場合、IL-7 を加えると対照に比べて約 2 倍の細胞数の増加が認められた。一方、SOC により IL-7 の効果を調べたところ、IL-7 の存在下では対照に比べて細胞数が 10 倍以上になっていた。次に胎生 14 日目の FT を用いて IL-7 を加えて SOC を行くと、回収された細胞の 20% が CD3 陽性であった。これらの結果は本実験における結果と一致する。ただし、彼らの報告からはこれらの CD3 陽性細胞は、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞のうちどちらなのかは不明であった。

新生児胸腺の浸水器官培養 (NBTSOC)

以上のように IL-7 は胎児胸腺という環境内で、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成を誘導することがわかった。しかしこの結果は、もともと $\alpha\beta$ 型 T 細胞に比べて $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成が活発である、胎児胸腺という環境内においてのみ、導き出されるのかもしれない。そこで $\alpha\beta$ 型 T 細胞が優勢を占めている、成体型の胸腺の環境内における、IL-7 の効果を調べることにした。ただし、実際には成体胸腺を用いた SOC は、その容積から考えて無理であるため、胸腺の構造、胸腺細胞の各サブセットの構成からみて、ほぼ同じと考えられる NB T を用いて SOC を行うことにした (NBTSOC)。

まずはじめに IL-7 非存在下で培養を行った場合、培養 2 週間後には、細胞数は培養前の 1 % 以下となり激減していた (表 7)。 $\alpha\beta$ 型 T 細胞、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合は (図 15 B)、培養の前後ではほとんど変わらず、培養後も $\alpha\beta$ 型 T 細胞が優勢を占めていた。また CD 4 / CD 8 の発現パターンについてみると (図 14 i)、CD 4⁻ CD 8⁺ 細胞がほとんどみられないが、他のサブセットについては存在が認められた。次に IL-7 を加えて培養を行ったところ、培養 2 週間後には細胞数は培養前の約 15 % で、対照に比べて増大しているのがわかった (表 7)。CD 4 / CD 8 の発現パターンについては、CD 4⁻ CD 8⁺ 細胞を含む全てのサブセットが認められた (図 14 m)。また $\alpha\beta$ 型 T 細胞、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合については、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞が培養 2 週間後には、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞の割合よりも高くなっていた (図 15 B)。細胞数も $\gamma\delta$ 型 T 細胞は培養前の約 7 倍となり、増加していることがわかった。また $\alpha\beta$ 型 T 細胞については培養前に比べて細胞数の増加はみられず、培養前の細胞数を

成熟型 $\alpha\beta$ 型 T 細胞と考えられる、 $\alpha\beta$ を高発現している細胞に限定しても、細胞数の増加は認められなかった。以上の結果より、IL-7 は $\alpha\beta$ 型 T 細胞の分化・増殖が優勢である、成体型胸腺の環境内においても、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成を誘導することが示された。

$\gamma\delta$ 型 T 細胞はその発生の時期や組織分布などからみて、異なるサブセットに分けられる (38)。たとえば胎生 14 日目から 17 日目の F T で発生し、生体では皮膚に分布する V γ 5 サブセット、胎生後期から新生児にかけての胸腺で発生し、生体では粘膜の上皮に分布する V γ 6 サブセット、そして成体の胸腺、リンパ節、ひ臓などのリンパ器官にみられる V γ 4 サブセットなどが知られている (38)。本実験においては、F T S O C と N B T S O C の両方で IL-7 を加えることにより、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖が見られたが、それぞれどういうサブセットが生じているかを調べることは今後の課題である。

前項で述べたように、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の生成を誘導すると考えられる他の増殖因子としては、IL-2 があげられる。そこで、IL-7 の N B T S O C における効果とを比較するために、IL-2 を加えて N B T S O C を行った。その結果、細胞数は培養 2 週間ではじめの約 10 % と、IL-7 によりみられた効果とあまり差はみられなかった (表 7)。C D 4 / C D 8 の発現パターンについても (図 14 q, m), IL-7 を加えた場合とほぼ同じであった。次に $\alpha\beta$ 型 T 細胞、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合をみると (図 15 C)、培養後には $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合の増加はみられるものの、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞が優勢を占めることに変わりはない。また $\gamma\delta$ 型 T 細胞の細胞数は、培養前の約 1.5 倍となり増加が認められた。以上の結果より、成体型胸腺の環境内で、IL-2 は確かに $\gamma\delta$ 型

T細胞の生成を誘導したが、その効果はIL-7程ではない、と結論できる。

IL-7、IL-2での培養後の細胞の $\gamma\delta$ の発現パターンをみると(図14 p, t), $\gamma\delta$ を高発現しているサブセットと低発現しているサブセットの二つに分かれた。ヒトのT細胞を用いて Veronika らは、 $\gamma\delta$ を低発現している細胞があり、これをIL-2またはIL-7を加えて培養することで、 $\gamma\delta$ を高発現する細胞が出現することを見出し、後者は前者より成熟・分化したのではないかと議論している(39)。本実験でみられる二つのサブセットについては、現在のところ何を意味するのかは不明であるが、彼らのいうように分化・成熟度の違いを反映しているのかも知れない。

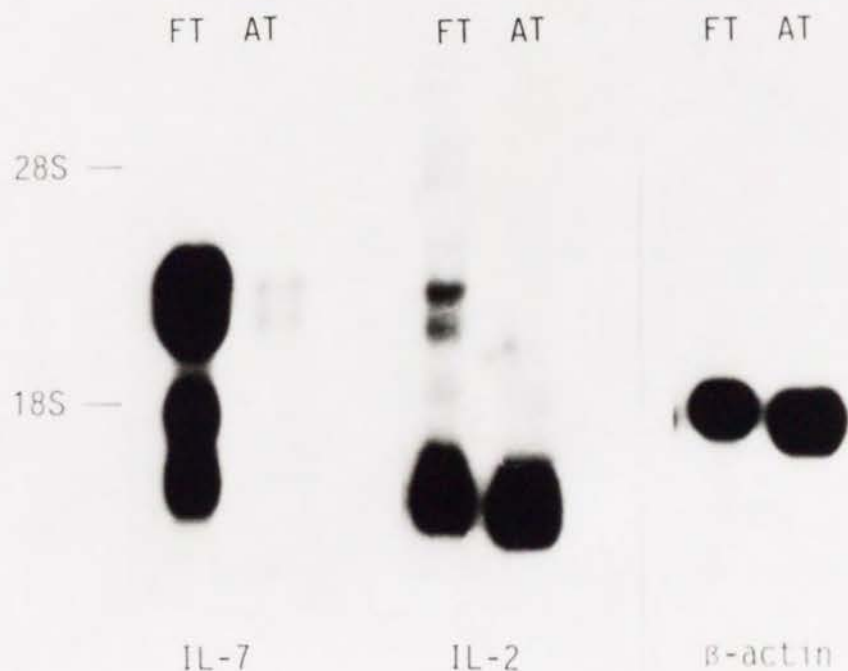
NBT SOCに関しては他では行われておらず、本実験の結果を他と直接に比較検討することはできないが、Georges らは胎生18日目のマウスFT(多数のDP細胞と少数のSP細胞を含む)を用いて、FTOCをIL-2を加えて行っている(40)。彼らは、培養1週後に、IL-2を加えた場合と加えない場合の両方で、 $\gamma\delta$ 型T細胞の細胞数はほとんど変わらないと報告している。本実験においても、培養1週後では未だ $\gamma\delta$ 型T細胞の増加は認められなかったもので、彼らの行った培養での2週後の結果に興味が持たれる。

本実験ではSOCを行うことにより、IL-7のT細胞に対する効果をより生体に近い効果で調べてきた。さらに一步進めて、生体内でのIL-7の効果を調べるために、IL-7のトランスジェニックマウスをSamaridis らは作製した(41)。彼らはリンパ球特異的にIL-7を発現させた結果、一番大きく影響を受けたのはB細胞だったが、T細胞

も胸腺細胞の細胞数の増加が認められた。また胸腺細胞のCD3、CD4/CD8の発現パターンは正常マウスと差異は認められなかった。そして $\gamma\delta$ 型T細胞の著しい増加はとくに認められず、本実験の結果とは一致しなかった。ただし、彼らの実験ではIL-7の発現が、B細胞のIgH鎖のエンハンサーと κ L鎖のエンハンサー、プロモーターの下に制御されており、各T細胞に十分にIL-7が発現しているという保証はない。またノーザン法により胸腺におけるIL-7の発現量を調べた限りでは、導入遺伝子のIL-7の発現量は、内在性のIL-7の発現量に比べて低く、その発現量は十分であるとはいえない。以上のことから、彼らの行った実験のみより、生体内ではIL-7は $\gamma\delta$ 型T細胞の生成に対して効果がない、と結論することはできない。

F TにおけるIL-7の発現

本実験の結果より、SOCに用いた胸腺の時期の如何を問わず、IL-7を加えることで、 $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖が誘導されることが示された。もしこれが実際に生体内においてもあてはまるのであれば、このことは胸腺中の $\gamma\delta$ 型T細胞の増減が、胸腺におけるIL-7の発現量に依存することを意味するはずである。そこで $\gamma\delta$ 型T細胞の分化・増殖が活発であると考えられる胎生15日目のFTと、逆に $\alpha\beta$ 型T細胞の分化・増殖の活発な成体胸腺(adult thymus: AT)より、RNAを回収してノーザン法にてIL-7の発現量を比較した(図16)。その結果、ATに比べてFTで非常に強いIL-7の発現がみられた。この結果は、FTにおいてIL-7の発現量が非常に多いために、 $\gamma\delta$ 型T細胞の分化・増殖がFTにおいて活発であることを示唆している。またIL-2



Northern blot analysis of fetal and adult thymuses. Poly (A)⁺ RNA (4 μ g/lane) prepared from FT and adult thymus was electrophoresed in a 1% agarose/formaldehyde gel, transferred to a nylon membrane and hybridized with an IL-7 and an IL-2 probe. A β -actin probe was used as a control for the amount of RNA loaded. The positions of 18S and 28S ribosomal RNA markers are indicated to the left of the blots.

に関しても、ノーザン法にて発現量の比較を行ったが、F TとA Tの間でその発現量はほとんど変わらず、N B T S O Cの実験とを合わせて考えると、I L - 2は胎生期における $\gamma \delta$ 型T細胞の分化・増殖に、I L - 7ほど影響を及ぼす因子だとは考え難い。

Montgomery らは polymerase chain reaction (P C R) 法を用いて、マウスのF Tにおけるサイトカインの発現について調べている(42)。F Tとしては胎生14日目から20日目までのものを用いて解析している。P C R法を用いたことにより、通常のノーザン法に比べて、微量のサンプルR N Aより高感度にR N Aの発現を検出できるのだが、その反面、発現量の多少に関して判定することは一般に困難である。彼らによれば、サイトカインの発現パターンは、胎生14日目から20日目にかけてずっと発現しているサイトカインと、胎生16日目に初めて発現が認められ、その後20日目まで発現しているサイトカインの二つのパターンがある。前者にはI L - 1 β 、- 4、- 5、- 6、- 7、L T、I F N - γ が含まれ、後者にはI L - 1 α 、- 2、- 3、G M - C S Fが含まれる。このことは、F Tにおけるサイトカインの発現の調節方法の一つとして、発現の有無という明確な方法が取られていることを示している。さて本実験ではノーザン法を用いて、胎生15日目の胸腺中にI L - 2の発現を認めたが、これは彼らの結果とは一致しない(彼らは胎生16日目に初めてI L - 2の発現を確認している)。この理由の一つとして考えられるのは、胎生期の日時の設定のズレという可能性である。もし胎生15日目の後半期または16日目の前半期に、彼らの報告するサイトカイン発現のスイッチが入るのであれば、多少の時間のずれはあるので、二つの事実は必ずしも矛盾しない。いずれにせよ、胎生前

期に IL-2 の発現がとくに高いという事実は認められなかった。IL-7 に関して彼らは PCR 法を用いて、半定量的に発現量の経時変化を調べたところ、胎生 16 日目から 17 日目にかけて発現量の減少がみられ、その後胎生 20 日目まで減少を続けていた。彼らの実験からは実際の発現量の違い（例えば胎生 16 日目と 17 日目）はわからないが、胎生 14 日目から 16 日目にかけて IL-7 の高発現がみられるという点で、本実験の結果と一致していた。本実験と彼らの実験とを合わせて考えると、胸腺中のサイトカインの発現の調節は発現の有無だけではなく、その量的な違いからも行われていることが示唆された。胎生期においては、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖・分化以外に $\alpha\beta$ 型 T 細胞においても、胎生 16 日目から CD8 が、また 17 日目から CD4、 $\alpha\beta$ 等が発現し始める。そのため、この時期の FT における各種サイトカインの発現量の経時変化を調べることは、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞の生成にどのようなサイトカインが関与しているのかを知る意味でも重要であると考えられ、今後の課題である。

第二部のまとめ

IL-7 の T 細胞の生成における役割を知るために SC と SOC を行い、IL-7 の及ぼす効果について検討を行った。結果は以下に示す通りである。

1) FTSC では、IL-7 は $\gamma\delta$ 型 T 細胞の維持（または増殖）に働いた。

2) NBTSC では、IL-7 は T 細胞受容体を保有する T 細胞の維持（または増殖）に働いた。

- 3) FT SOCでは、IL-7は主として $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖に働いた。
- 4) NB T SOCでは、 $\alpha\beta$ 型T細胞の生成が活発である環境内でも、IL-7は $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖に働いた。
- 5) FTとATにおけるIL-7の発現量を比較したところ、FTにおいてIL-7の非常に強い発現が見られた。

以上のことから、IL-7は胸腺由来の何らかのシグナルと共に働いて、 $\gamma\delta$ 型T細胞の生成を誘導することが示された。またFTにおいて、IL-7が強く発現しているために、 $\gamma\delta$ 型T細胞の生成が活発となっていることが考えられた。

[結 語]

この論文では、第一部において、胸腺繊維芽細胞由来のストローマ細胞株 T S t - 4 を用いた研究について述べた。T S t - 4 細胞は、胸腺細胞のなかでも T 幹細胞活性を保有する D N 細胞より、C D 3⁺ C D 4⁺ C D 8⁻ 細胞の生成、またヘルパー活性を発現する細胞の生成を誘導し、この現象にはおそらく、T S t - 4 により産生される I L - 7 が関与していることが示された。第二部において、I L - 7 を用いて二通りの胸腺細胞の培養を行い、I L - 7 がとくに $\gamma \delta$ 型 T 細胞の生成を誘導すること、また F T において I L - 7 が強く発現していることから、胎生期において $\gamma \delta$ 型 T 細胞の生成が活発なのは、I L - 7 の強発現によることが考えられた。

第一部の研究においては、T S t - 4 を用いて T 細胞分化の研究を行い、その過程の一部を調べるのが可能となったが、分化の全行程を知るためには、他の分化誘導能を持った細胞株が必要となる。すなわち、胸腺を構成する上皮細胞、M ϕ 、D C 等の細胞株化が今後必要となる一方で、これらの細胞株を組み合わせ用いて、生体内での行程を再現する試みも必要となろう。また T 細胞分化において、I L - 7 が重要な役割を果たすことが示唆されたが、I L - 7 の発現を誘導するメカニズムを解析することは重要だと考えられる。一つの可能性としては、ストローマ細胞と T 細胞の間の相互作用の結果、I L - 7 が産生されることが考えられる。

第二部の研究においては、I L - 7 が $\gamma \delta$ 型 T 細胞の生成を誘導する際に、胸腺由来の何らかのシグナルと共に働いている可能性が示された。今後このシグナルの実体を解明することも重要であると考えられる。

今後、ますます *in vitro* の系を用いて T 細胞分化の研究が行われていくだろうが、この実験で行ったように、生体に近い条件下の方法を用いて、結果を検討することが重要であろう。

[材料と方法 (第一部及び第二部)]

マウス : 成体マウスとして、3ヶ月齢から5ヶ月齢のC57BL/6、BALB/c系統のマウスを用いた。新生児マウスとしては、生後3日目のC57BL/6マウスを用いた。また妊娠マウスとして、日本SLC社より得たC57BL/6マウスを用いた。

培養液 : 細胞浮遊液の調整や抗体補体処理の際は、イーグルMEM-5%牛胎児血清(FCS)を用いた。ストローマ細胞の培養の際は、RPMI 1640 (5% FCS、50 μ M 2-ME、50 μ g/ml ストレプトマイシン、50 U/ml ペニシリンを含む)を用いた。この培養液は、ヘルパー活性の測定とSOCの際にも用いた。SCの際はRPMI 1640 (10% FCS、50 μ M 2-ME、100 μ g/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン、2 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウム、0.1 mM NEAASを含む)を用いた。

サイトカインと抗体 : リコンビナントIL-2 (rIL-2) は塩野義製薬より、rIL-7は須藤博士(東レ中央研)より供与された。マウス抗体として、抗Thy1.2 (HO-13.4)、抗Lyt2.2 (HO-2.2)、抗MHC class-1, H-2K^b (B8-24-3)、抗MHC class-2, I-A^{b_de}, I-E^{d_k} (M5/114.15.2)等の抗体を用いた。ラット抗体として、抗M ϕ (Mac-1)、抗DC (NLDC-145)、抗赤血球 (TER)、抗上皮系細胞 (Th

- 3, Th-4), 抗L3T4 (RL172.4, GK1.5)、他に Sca-1, M1/69, pgp-1, N-CAM等の抗体を用いた。ハムスター抗体として、抗CD3 (145-2C11)、抗 $\alpha\beta$ (H57-597)、抗 $\gamma\delta$ (3A10)等の抗体を用いた。以上の抗体のハイブリドーマの培養上清を一次抗体として用いた。二次抗体として、FITC-ヤギ抗マウスIg、FITC-ヤギ抗ラットIg、FITC-ウサギ抗ハムスターIg、PE-ラビット抗ラットIg等の抗体を使用した。またその他にFITC-抗CD8、PE-抗CD4を使用した。

DN細胞の回収 : DN細胞は胸腺細胞を抗L3T4抗体 (RL172.4)、抗Ly t 2.2抗体 (HO-2.2)、ウサギ補体の混合液にて、2回処理を行うことで得た。細胞の回収率は約0.5%であり、そのうち99%以上がDN細胞であった。

suspension culture (SC) : 胎生15日目のFT、または生後3日目のNB Tをステンレスメッシュ上ですりつぶし、細胞の浮遊液を用意した。細胞数はトリパンブルー染色により計測した。細胞は24穴プレートに1穴当たり、 2×10^5 の細胞数、培養液2ml中で培養した。培養は37℃、CO₂濃度7.5%の条件下で行った。サイトカインは培養の始めに加えるが、2週間の培養を行う際は、培養7日目の培養液の交換のときに再び加えた。培養終了後、細胞を回収、細胞数を計測し、表面抗原の発現パターンをフローサイトメーターにて解析した。

submersioned organ culture (SOC) : FTまたはNB Tの各器官

を24穴プレートに1穴当たり1個を培養液2 ml 中で培養した。培養条件（培養液の組成を除く）はSCの場合と同じである。培養終了後、器官内の細胞と、外にあふれ出た細胞を合わせて回収し、以後の解析に用いた。

細胞表面の染色とフローサイトメトリー：全ての行程は氷水浴上で行った。間接抗体法の際は、まず $2-5 \times 10^5$ の細胞を遠沈し、 $50 \mu\text{l}$ の一次抗体で混合し、30分間インキュベーションを行う。1回細胞を洗った後、 $10 \mu\text{l}$ の二次抗体を加え20分間インキュベーションを行う。1回細胞を洗った後、 $1-5 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整し、ナイロンメッシュに通した後、フローサイトメーター、FACSscan (Becton-Dickinson 社) にて解析を行った（一部、昭和電工社のABCAS-100を用いて解析を行った場合もある）。

ヘルパー活性の測定：ヘルパー活性を測定する細胞を、C57BL/6マウスの脾臓B細胞 5×10^4 と混合し、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ のConA存在下で5日間培養を行った。培養終了後、培養上清中のIgM濃度をラジオイムノアッセイ法にて測定した。

Haemopoietic colony assay：メチルセルロースを含む培養液は、 α -MEM (20% FCS) 中に0.8%のメチルセルロース (4,000 cps) を加えたものである。35mmのペトリディッシュに $2 \times 10^4 / \text{ml}$ の骨髓細胞を100ユニットのrIL-3、またはTSt-4の培養上清20%と共に培養し、8日後に倒立顕微鏡下でコロニー数を

計測した。

混合白血球反応 (MLR) : 応答細胞としては、DN細胞をTS t - 4単層上で、7日間、IL - 7の存在下で培養した後に回収した細胞を用いた。刺激細胞としては、C 5 7 B L / 6、B A L B / cマウスの脾臓細胞 (3, 5 0 0 r a dで照射された) を用いた。9 6 穴プレート (丸底) に、応答細胞と 5×10^5 の刺激細胞を加えて、5日間培養した。細胞を回収する8時間前に、各穴0. 5 μ C i の [3 H] - T d Rを加えた。

ノーザンプロット (ノーザン) 法 : 細胞内全RNAは、TS t - 4、TEC 1 - 4 C 1 8、PWMで刺激した脾細胞、胎生15日目の胸腺、成体胸腺等よりグアニジン / C s C l 法 (43) により回収した。poly (A) + RNAはoligo - d T - セルロースカラムを用いて選択した (44)。1サンプルにつき2 ~ 4 μ g の poly (A) + RNAを1%アガロース / ホルムアルデヒド・ゲルに電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。メンブレンを各種プローブにてハイブリダイズした。

REFERENCES(Part I and Part II)

1. Moore, M. A. S., and J. J. T. Owen., J. Exp. Med. 126, 715, 1967.
2. Marrack, P., E. Kushnir., W. Born., M. McDuffie., and J. Kappler., J. Immunol. 140, 2508, 1988.
3. Katsura, Y., T. Kina., Y. Takaoki., and S. Nishikawa., Eur. J. Immunol. 18, 889, 1989.
4. Hunig, T., Immunol. Today. 4, 84, 1983.
5. Van Ewijk, W., Lab. Inves. 59, 579, 1988.
6. Boyd, R. L., and P. Hugo., Immunol. Today. 12, 71, 1991.
7. Jenkinson, E. J., L. L. Franchi., R. Kingston., and J. J. T. Owen., Eur. J. Immunol. 12, 583, 1982.
8. Ready, A. R., E. J. Jenkinson., and J. J. T. Owen., Nature. 310, 231, 1984.
9. Watanabe, Y., J. -I. Gyotoku., and Y. Katsura., Thymus. 13, 47, 1989.
10. Van Ewijk, W., Annu. Rev. Immunol. 9, 591, 1991.
11. de la Hera, A., W. Marston., C. Aranda., M. -L. Toribio., and C. Martinez-A., Inter. Immunol. 1, 471, 1989.
12. Denning, S. M., J. Kurtzberg., P. T. Le, D. T. Tuck., K. H. Singer., and B. F. Haynes., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 3125, 1988.
13. Eshel, I., N. Savion., and J. Shoham., J. Immunol. 144, 1554, 1990.
14. Imhof, B. A., M. -A. Deungnier., J. -M. Girault., S. Champion., C. Damais., T. Itoh., and J. P. Thiery., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7699, 1988.
15. Ranson, J., M. Fisher., L. Mercer., and A. Zlotnik., J. Immunol. 139, 2620, 1987.

16. Blackman, M., J. Kappler., and P. Marrack., Science. 248, 1335, 1990.
17. Von Boehmer, H., and P. Kisielow., Science. 248, 1369, 1990.
18. Fowlkes, B. J., L. Edison., B. J. Mathieson., and T. M. Chused., J. Exp. Med. 162, 802, 1985.
19. Wilson, A., A. D'Amico., T. Ewing., R. Scollay., and K. Shortman., J. Immunol. 140, 1461, 1988.
20. Uckun, F. M., L. T. Ahlgren., V. Obuz., R. Smith., I. Diberdik., M. Hanson., M. C. Langlie., and J. A. Ledbetter., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 6323, 1991.
21. Sudo, T., M. Ito., Y. Ogawa., M. Iizuka., H. Kodama., T. Kunisada., S-I. Hayashi., M. Ogawa., K. Sakai., S. Nishikawa., and S-I. Nishikawa., J. Exp. Med. 170, 333, 1989.
22. Dainiak, N., Blood. 78, 264, 1991.
23. Nakashima, M., K. Mori., K. Maeda., H. Kishi., K. Hirata., M. Kawabuchi., and T. Watanabe., Eur. J. Immunol. 20, 47, 1990.
24. Hiramane, C., K. Hojo., M. Koseto., T. Nakagawa., and A. Mukasa., Lab. Inves. 62, 41, 1990.
25. Nishimura, T., Y. Takeuchi., Y. Ichimura., X. Gao., A. Akatsuka., N. Tamaoki., H. Yagita., K. Okumura., and S. Habu., J. Immunol. 145, 4012, 1990.
26. Tatsumi, Y., A. Kumanogou., M. Satoh., Y. Mizushima., K. Kimura., S. Suzuki., H. Yagi., A. Horiuchi., M. Ogata., T. Hamaoka., and H. Fujiwara., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 2750, 1990.
27. Watson, J. D., P. J. Morrissey., A. E. Namen., P. J. Conlon., and M. B. Widmer., J. Immunol. 143, 1215, 1989.
28. Morrissey, P. J., R. G. Goodwin., R. P. Nordan., D. Anderson., K. H. Grabstein., D. Cosman., J. Sims., S. Lupton., B. Acres., S. G. Reed., D. Mochizuki., J. Eisenman., P. J. Conlon., and A. E. Namen., J. Exp. Med. 169, 707, 1989.
29. Hickman, C. J., J. A. Crim., H. S. Motowski., and J. P. Siegel., J. Immunol. 145, 2415, 1990.

30. Murray, R., T. Suda., N. Wrighton., F. Ree., and A. Zlotnik., Int. Immunol. 1, 526, 1989.
31. Conlon, P. J., P. J. Morrissey., R. P. Nordan., K. H. Grabstein., K. S. Prickett., S. G. Reed., R. Goodwin., D. Cosman., and A. E. Namen., Blood. 74, 1368, 1989.
32. Suda, T., R. Murray., C. Guidos., and A. Zlotnik., J. Immunol. 144, 3039, 1990.
33. Suda, T., and A. Zlotnik., J. Immunol. 146, 3068, 1991.
34. Hayashi, S-I., T. Kunisada., M. Ogawa., T. Sudo., H. Kodama., T. Suda., S. Nishikawa., and S-I. Nishikawa., J. Exp. Med. 171, 1683, 1990.
35. Ceredig, R., J. Medveczky., and A. Skulimopwski., J. Immunol. 142, 3353, 1989.
36. Barcena, A., M. L. Toribio., L. Pezzi., and C. Martinez-A., J. Exp. Med. 172, 439, 1990.
37. Plum, J., M. De Smedt., G. Leclercq., and B. Tison., J. Immunol. 145, 1066, 1990.
38. Ferric, D. A., B. Sydora., V. Wallace., L. G. Hori., M. Kronenbeg., and T. W. Mak., Immunol. Rev. 120, 51, 1991.
39. Groh, V., M. Fabbi., and J. L. Strominger., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 5973, 1990.
40. Leclercq, G., M. De Smedt., B. Tison., and J. Plum., J. Immunol. 145, 3992, 1990.
41. Samaridis, J., G. Casorati., A. Traunecker., A. Iglesias., J. C. Gutierrez., U. Muller., and R. Palacios., Eur. J. Immunol. 21, 453, 1991.
42. Montgomery, R. A., and M. J. Dallman., J. Immunol. 147, 554, 1991.
43. Chirgwin, J. M., A. E. Pyzybyla., R. J. MacDonald., and W. J. Rutter., Biochemistry. 18, 5294, 1979.

44. Sambrook, J., E. F. Fritsch., and T. Maniatis., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.